

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACIA**

HÉLEN ZOCHE SOPRANA

**EFEITO DA PROTEÍNA CELULAR DO PRION (PrP^C) NA ATIVIDADE
DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM CÉLULAS
VASCULARES SOB ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liliete Canes Souza

Florianópolis

2008

HÉLEN ZOCHE SOPRANA

**EFEITO DA PROTEÍNA CELULAR DO PRION (PrP^C) NA ATIVIDADE
DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM CÉLULAS
VASCULARES SOB ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liliete Canes Souza

Florianópolis

2008

HÉLEN ZOCHE SOPRANA

**EFEITO DA PROTEÍNA CELULAR DO PRION (PrP^C) NA ATIVIDADE
DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM CÉLULAS
VASCULARES SOB ESTRESSE OXIDATIVO**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do título de Mestre em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2008.

Professora e orientadora Dra. Liliete Canes Souza
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creckzynski Pasa
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Cláudia Roberta de Andrade
Instituto do Coração – Faculdade de Medicina - USP

Ao meu pai, Nailor, e à minha mãe, Lourdes, que sempre me incentivaram a estudar, aos quais devo, em grande parte, o que hoje sou.

AGRADECIMENTOS

Após uma jornada destas é muito bom ter tanto a agradecer.

É muito gratificante dizer **obrigada** a tantas pessoas que, em um período, onde se é acometida de tantos momentos de tristeza, incapacidade, euforia, incerteza, cansaço, alegrias, e algumas vezes falta de coragem, conseguiram manter-se simplesmente presente.

Ao bom Deus, a graça de estar simplesmente viva, e de poder ter chegado até aqui....

Aos meus pais, Nailor e Lourdes, pelo imenso amor, constante estímulo, enorme compreensão e pelas orações.

A minha irmã Cynthia, pela compreensão, ajuda e amizade.

Ao meu esposo Jander, pelas palavras positivas, apoio e compreensão em todos os momentos.

A toda a minha família, pelo incentivo, apoio, exemplo e confiança.

A Prof^a Dr^a Liliete Canes Souza, pela orientação, oportunidade, dedicação e amizade.

Ao Prof^o Francisco Rafael Laurindo, pelos valiosos ensinamentos e sua disponibilidade.

A Prof^a Dr^a Vilma Regina Martins, pela sua contribuição ao projeto.

Ao Prof^o Dr^o Jamil Assreuy, por ter disponibilizado materiais e reagentes para execução dos ensaios de *western blotting* em seu laboratório.

Ao querido amigo Victor Debbas, por sua incansável disponibilidade em ajudar nos experimentos e respostas imediatas aos e-mails com pedido de “socorro”.

Às amigas Leonora Loppnow e Bettina Tomio Heckert, que gentilmente ajudaram em alguns ensaios.

À minha “prima” do coração, pela ajuda incansável e hospedagem em todas as minhas viagens a São Paulo.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (InCor/FMUSP), pelos bons momentos compartilhados durante os meses de estudo.

Ao meu tio, Prof^o Dr^o Jairo José Zocche, por sua experiência, disponibilidade e paciência durante a elaboração da dissertação.

Aos professores que aceitaram participar da banca examinadora.

Aos docentes do Departamento de Ciências Farmacêuticas e de Análises Clínicas, pelos ensinamentos.

Ao secretário do PGFAR, Rodrigo, pela paciência e auxílio.

À UFSC e ao InCor/FMUSP, pela viabilidade da pesquisa.

Ao casal André e Elyse, pela hospedagem em sua casa em São Paulo.

Às amigas Janaína e Bruna, que sempre ajudaram da melhor maneira, descontraindo e apoiando durante este período.

A todos os colegas educadores e educandos, que acreditaram no meu trabalho.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“É melhor tentar e falhar,
que se preocupar e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ...”*

Martin Luther King

EFEITO DA PROTEÍNA CELULAR DO PRION (PrP^C) NA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM CÉLULAS VASCULARES SOB ESTRESSE OXIDATIVO

RESUMO

A proteína celular do prion (PrP^C) é expressa em vários tipos celulares, especialmente em neurônios. Sua função fisiológica é desconhecida, no entanto, seu papel no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas foi bem descrito, as quais resultam de uma mudança conformacional da PrP^C para a forma *scrapie* (PrP^{Sc}). Vários estudos têm mostrado uma associação entre a PrP^C, o metabolismo do cobre e a atividade antioxidante da superóxido dismutase (SOD). Contudo, os processos celulares envolvendo a PrP^C, neste contexto, permanecem indefinidos. Considerando que o padrão de expressão protéica da SOD em vasos lesados foi similar ao verificado no cérebro de camundongos *knockout* para a PrP^C, a hipótese do presente estudo foi que alterações da expressão da PrP^C levariam à anormalidade da regulação do cobre e induziriam sub-atividade da SOD da parede vascular. Assim, nossos objetivos foram estudar se a expressão da PrP^C sofre indução por agentes que desencadeiam o estresse do retículo endoplasmático (RE) e determinar seu envolvimento no que se refere à atividade da SOD. Análises de *western blotting* e RT-PCR foram usadas para determinar a ocorrência de alteração da expressão da PrP^C na presença de estresse do RE. Células musculares lisas de aorta de coelho foram cultivadas por diferentes períodos de tempo (4, 8 e 18 horas), com agentes estressores do RE, angiotensina II (AngII, 100 nM), tunicamicina (Tn, 5 µg/mL) e 7-cetocolesterol (7kc, 5 µg/mL). A atividade da SOD foi determinada pelo método de inibição da redução do citocromo c, e a atividade basal da SOD foi 13,9±1,2 U/mg de proteína. O estresse do RE produziu diminuição significativa na atividade da SOD após incubação por 4 horas com Tn (29%) e 7kc (12%), 8 horas com Tn (37%), bem como, após 18 horas com AngII (42%) e 7kc (32%); inversamente, foi observado um aumento significativo na atividade da SOD nas células expostas a AngII (41%) durante 8 horas. A concentração celular de cobre, determinada através de espectroscopia de absorção atômica, foi cerca de 9 vezes maior nas células estimuladas com AngII por 8 horas. As análises de *western blotting* para as isoenzimas da SOD mostraram um perfil variado de expressão, em todos os tempos de incubação com os diferentes estímulos, que não se correlacionou com a atividade enzimática. A expressão da PrP^C diminuiu após a exposição a todos os estímulos nos diferentes tempos de incubação. Os ensaios de RT-PCR mostraram aumento da expressão do mRNA para PrP^C apenas nas células estimuladas durante 8 horas com os diferentes agentes estressores. A expressão do mRNA para PrP^C também foi avaliada em fragmentos de artérias ilíacas de coelhos submetidos à lesão por cateter balão, com sobrevida de 7 e 14 dias, bem como logo após a lesão. Neste ensaio, a expressão do mRNA para PrP^C apresentou aumento pronunciado no grupo avaliado logo após a lesão. Os resultados obtidos com os modelos de estresse do RE vascular aqui utilizados não demonstraram um perfil de atividade antioxidante para a PrP^C. O que não descarta a hipótese desta proteína estar envolvida em outro tipo de resposta celular frente ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: superóxido dismutase, proteína celular do prion, estresse do retículo endoplasmático, células musculares lisas de aorta de coelho.

EFFECT OF THE CELLULAR PRION PROTEIN (PrP^C) IN THE ACTIVITY OF THE SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) IN VASCULAR CELLS UNDER OXIDATIVE STRESS

ABSTRACT

The cellular prion protein (PrP^C) is expressed in several cell types, especially in neurons. Its physiological function is unknown, however, the role in neurodegenerative diseases development has been well described, resulting from a conformational change of PrP^C in the *scrapie* form (PrP^{Sc}). Several studies have shown an association between the PrP^C, the metabolism of copper and the antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD). However, the cellular processes involving the PrP^C in this context, remain unclear. Whereas the protein expression pattern of SOD in injured arteries was similar to that seen in knockout mice brain for PrP^C, the hypothesis of this study was that changes in PrP^C expression leads to copper regulation abnormality and induces SOD down regulation in the vascular wall. Thus, our objectives were to study whether the PrP^C expression suffers induction by agents that trigger the endoplasmic retículo stress (ERS) and to determine its involvement in SOD activity. Western blotting analysis and RT-PCR was used to determine changes in the PrP^C expression during the ERS. Rabbit aortic smooth muscle cells were challenged for different periods (4, 8 and 18 hours) with the stressors agents of the RE, angiotensin II (AngII, 100 nM), tunicamycin (Tn, 5 µg/mL) and 7 - ketocholesterol (7kc, 5 µg/mL). The SOD activity was determined through inhibition of cytochrome c reduction and baseline SOD activity was 13.9 ± 1.2 U/mg protein. The ERS produced significant decreases in the SOD activity after incubation of 4 hours with Tn (29%) and 7kc (12%), 8 hours with Tn (37%), and after 18 hours with AngII (42%) and 7kc (32%); conversely, a significant increase in SOD activity was obtained in cells exposed to AngII (41%) for 8 hours. The cellular copper concentration determined by atomic absorption spectroscopy, was about 9 times greater in cells stimulated with AngII for 8 hours. Western blotting analyzes for SOD isoenzymes showed an expression profile that did not correlate with enzymatic activity. The PrP^C expression decreased after exposure to all agents in different times of incubation. RT-PCR assay showed increased mRNA expression for PrP^C only in cells stimulated for 8 hours with the different stressors. The mRNA expression for PrP^C was also evaluated in fragments of rabbits aortic arteries subjected to injury by balloon catheter, with survival of 7 and 14 days, and immediately after the injury. In this study the mRNA expression for PrP^C presented pronounced increase in the group evaluated immediately after the injury. The results obtained with the models of vascular ERS used here did not demonstrate a profile of antioxidant activity for the PrP^C. This not casts off the hypothesis that the protein could be involved in another cellular response in front of oxidative stress. **Key words:** superoxide dismutase, oxidative stress, cellular prion protein, endoplasmic reticulum stress, rabbit aortic smooth muscle cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da localização subcelular das 3 isoformas da SOD	9
Figura 2: Atividade da SOD (UI/mg de proteína) em homogenato de células RASM (n=3) estimuladas por 4, 8 e 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. *p < 0,05	30
Figura 3: Concentração de cobre (µg/mL) no <i>pool</i> de 3 amostras de cultura de células RASM nos diferentes tempos de incubação (4, 8 e 18 horas) com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL.....	31
Figura 4: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da CuZnSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 4 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	32
Figura 5: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da CuZnSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 8 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	33
Figura 6: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da CuZnSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	33
Figura 7: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da MnSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 4 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	34
Figura 8: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da MnSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas	

por 8 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	35
Figura 9: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da MnSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	35
Figura 10: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da EcSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 4 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	36
Figura 11: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da EcSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 8 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	36
Figura 12: Análise de <i>western blotting</i> para expressão da EcSOD, corrigidos pela expressão da β-actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras	37
Figura 13: Expressão da PrP ^C nas amostras de células RASM incubadas por 4 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras, corrigidos pela expressão da β-actina	38
Figura 14: Expressão da PrP ^C nas amostras de células RASM incubadas por 8 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras, corrigidos pela expressão da β-actina	38
Figura 15: Expressão da PrP ^C nas amostras de células RASM incubadas por 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL	

e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (<i>pool</i>) de 3 amostras, corrigidos pela expressão da β -actina	39
Figura 16: Expressão do mRNA para PrP ^C , em amostra isolada de células RASM, expostas por 4 horas aos estímulos angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL, corrigidos pela expressão do gene GAPDH.....	40
Figura 17: Expressão do mRNA para PrP ^C , em amostra isolada de células RASM, expostas por 8 horas aos estímulos angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL, corrigidos pela expressão do gene GAPDH.....	41
Figura 18: Expressão do mRNA para PrP ^C , em amostra isolada de células RASM, expostas por 18 horas aos estímulos angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL, corrigidos pela expressão do gene GAPDH.....	41
Figura 19: Expressão do mRNA para PrP ^C nas artérias ilíacas lesadas (L) e contra-laterais (CL) de coelhos com sobrevida de zero, 7 e 14 dias após a angioplastia da artéria ilíaca direita, comparadas com a expressão do mRNA nas amostras de artérias controle (C). A expressão do mRNA para PrP ^C foi corrigida pela expressão do gene para GAPDH nas mesmas amostras (n=2 para cada grupo)	42

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

•NO	Óxido Nítrico
7kc	7-cetocolesterol
Ang II	Angiotensina II
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (= soro de albumina bovina)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
Cu²⁺	Íon Cobre
CuZnSOD	Superóxido Dismutase Cobre-Zinco
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Dithiothreitol
EcSOD	Superóxido Dismutase Extracelular
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
EET	Encefalopatia Espongiforme Transmissível
F-12	Meio F-12 <i>Coon's</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (= SFB: Soro Fetal Bovino)
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
MnSOD	Superóxido Dismutase Manganês
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
O₂	Oxigênio Molecular
O₂^{•-}	Radical Ânion Superóxido
•OH	Radical Hidroxil
Oligo dT	Oligonucleotídeo Deoxitimidina
ONOO⁻	Peroxinitrito
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (= tampão salina fosfato)

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF	<i>Phenylmethysulfonyl Fluoride</i> (= fenilmetilsulfonilfluoreto)
PrP	Proteína do Prion
PrP^C	Proteína Celular do Prion
PrP^{Sc}	Proteína do Prion <i>Scrapie</i>
<i>Prn-p</i>^{0/0}	Proteína do Prion <i>knockout</i>
RASM	<i>Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells</i> (= células musculares lisas de aorta de coelho)
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase (compreende as 3 isoformas da enzima)
TBS	Tampão Tris Salina
TBST	Tampão Tris Salina <i>Tween</i>
Tn	Tunicamicina
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> (= células musculares lisas vasculares)
XO	Xantina Oxidase

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Proteína do Prion (PrP)	2
1.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	4
1.3 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	6
1.3.1 Isoenzimas da SOD	9
1.3.1.1 CuZnSOD	9
1.3.1.2 MnSOD	10
1.3.1.3 EcSOD	11
1.4 Estresse Oxidativo e Lesão Vascular	12
1.5 PrP ^C e Defesa Antioxidante	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Reagentes utilizados para estímulo celular	19
3.2 Cultura celular	19
3.3 Preparo do homogenato de células	20
3.4 Determinação da atividade total da enzima SOD	20
3.5 Determinação das concentrações de cobre	21
3.6 <i>Western Blotting</i>	22
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa	23
3.8 Angioplastia de artéria ilíaca de coelho	26

4 RESULTADOS	29
4.1 Determinação da atividade total da enzima SOD	30
4.2 Determinação das concentrações de cobre	30
4.3 <i>Western blotting</i>	31
4.4 RT-PCR para PrP ^C em células RASM	39
4.5 RT-PCR para PrP ^C , das artérias angioplastadas de coelhos	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8 ANEXOS	77
Anexo I: Laudo da análise das concentrações de cobre.....	78

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteína do Prion (PrP)

O termo “prion” refere-se a *proteinaceous*, partícula infecciosa responsável pela doença da vaca louca, *scrapie* em ovelhas e cabras (PRUSINER, 1997; PRUSINER, 1998). Tais enfermidades são referidas coletivamente como encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs). No homem as doenças do prion incluem a Creutzfeldt-Jakob, a síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker e a Insônia Familiar Fatal (HSIAO; PRUSINER, 1990; PRUSINER, 1991). As EETs podem apresentar-se como doenças infecciosas esporádicas, genéticas ou adquiridas. Os prions têm sido definidos como partículas transmissíveis, com potencial patogênico, desprovidas de alguns ácidos nucleicos, presumivelmente compostas de uma PrP^C que foi modificada (PRUSINER, 1998; LEGNAME et al., 2004). O mecanismo pelo qual a PrP^C sofre esta mudança conformacional para a forma PrP^{SC} e adquire sua propriedade infecciosa é pouco conhecido (BOLTON et al., 1982).

A proteína do prion (PrP) compreende duas isoformas: a normal (PrP^C) e a patológica (*scrapie*) (PrP^{SC}). A forma normal está presente em diversos tipos celulares, sendo particularmente encontrada em altas concentrações no sistema nervoso central (SNC). A PrP^C está ligada à superfície celular por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (CAUGHEY; CHESEBRO, 1997).

A proteína celular do prion (PrP^C) é uma glicoproteína de 33 a 35 kDa (PRUSINER, 1998; GLOCKSHUBER et al., 1998). A função fisiológica da PrP^C é desconhecida, no entanto, foi mostrado seu envolvimento no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas (PRUSINER, 1998), as quais resultam de uma mudança conformacional da PrP^C para a forma *scrapie*, chamada PrP^{SC} . A PrP^{SC} age como um molde para a conversão adicional da PrP^C em PrP^{SC} , facilitando assim, a formação de uma região de conversão e subsequente neurodegeneração (MILLHAUSER, 2004).

A isoforma patológica (PrP^{SC}) tem conteúdo aumentado de folhas beta em sua estrutura conformacional, e pode ser distinguida da PrP^C por sua relativa insolubilidade em detergentes e parcial resistência à degradação por proteases (BOLTON et al., 1982; MCKINLEY et al., 1983). Assim, a resistência da PrP^{SC} à

degradação por proteinase K tem sido utilizada como um marcador diagnóstico no estágio final da doença. Sob condições definidas, a proteinase K digere completamente a PrP^C, visto que, aproximadamente, 70 resíduos N-terminal da PrP^{SC} são digeridos por este tratamento, deixando uma porção protease-resistente de 27-30 kDa (BOLTON et al., 1982).

Uma vez que o mecanismo de infecção é desencadeado pela interação da PrP^{SC} com a PrP^C, o que provoca a alteração conformacional, a infecção se expande exponencialmente devido às novas moléculas de PrP^{SC} geradas. O acúmulo de PrP^{SC} insolúvel seria, provavelmente, um dos eventos que levaria à morte neuronal (PRUSINER, 1989).

O papel do sangue e vasos sangüíneos na propagação da EET permanece indefinido (BROWN et al., 2001). Embora não haja evidências da transmissão da EET por transfusão sangüínea, existe a preocupação de que humanos que tenham sido infectados, porém permaneçam assintomáticos, possam expandir a doença por doação de sangue. A expressão da PrP^C em diferentes células do sangue é altamente variável entre as espécies de mamíferos (HOLADA; VOSTAL, 2000; HOLADA et al., 2000). Células sangüíneas humanas, tais como, linfócitos, monócitos e plaquetas, expressam níveis substanciais de PrP^C (CASHMAN et al., 1990; DODELET; CASHMAN, 1998; HOLADA et al., 1998; BARCLAY et al., 1999), entretanto, somente um terço da PrP^C no sangue humano está associada às células, e o restante permanece presente no plasma (MACGREGOR et al., 1999).

Estudos utilizando o método de fluoroimunoensaio mostraram que as plaquetas e o plasma são os principais reservatórios da PrP^C no sangue humano, juntos constituindo cerca de 95% desta proteína no sangue (MACGREGOR et al., 1999). Além disso, uma avaliação da PrP^C em plaquetas de aférese, durante o estoque, mostrou que a proteína era liberada das plaquetas e que esta liberação estava, provavelmente, associada com a secreção de grânulos α protéicos (BESSOS et al., 2001).

Nas doenças do prion, os hospedeiros são infectados através do trato gastrointestinal, cujas células infectadas migram deste para o baço e depois causam a patologia no SNC (WCISSMANN et al., 2002). Diferentes tipos celulares, incluindo células imunes, contribuem para a replicação e transferência da forma infectante para sítios de replicação no cérebro (GLATZCL; AGUZZI, 2000). Os mecanismos

responsáveis pela transferência intercelular ainda não foram elucidados (HARRIS, 1999), podendo o contato entre células estar envolvido (KANU et al., 2002).

A solubilidade apresentada pela PrP^C permite sua mobilidade de célula para célula. Assim sendo, a liberação de PrP^{SC} por células expressando PrP pode representar um mecanismo celular potencial na propagação e replicação dos prions, por meio da ação indutora da PrP^{SC} na transconformação da PrP^C presente em células vizinhas (LIU et al., 2002).

Hornshaw e col. (1995a,b) sugeriram que a PrP^C tem afinidade por íons cobre (Cu²⁺). A região da proteína, primeiramente implicada nesta atividade foi chamada de domínio *octarepeat*, composto de múltiplas cópias de uma sequência de oito resíduos específicos PHGGGWGQ. As sequências da PrP de muitas espécies animais possuem quatro ou cinco cópias deste seguimento. O domínio *octarepeat* está localizado na porção N-terminal da proteína, aproximadamente, da posição 60 a 90, variando para diferentes espécies e número de octapeptídeos repetidos. Interessantemente, com a evolução das espécies, o domínio *octarepeat* está entre a porção mais altamente conservada da sequência da PrP, sugerindo seu envolvimento na função da PrP^C (WOPFNER et al., 1999).

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são derivadas do oxigênio molecular (O₂) produzidas em todas as células aeróbicas. Muitas EROs possuem elétrons desemparelhados e são chamadas de radicais livres. Estas espécies compreendem moléculas como o ânion radical superóxido (O₂⁻), o radical hidroxil ([•]OH) e os radicais lipídicos. Outras EROs, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o oxigênio singlete (¹O₂) e o ácido hipocloroso (HOCl), não são radicais livres *per se*, mas têm efeitos oxidantes que contribuem para o estresse oxidativo (CAI; HARRISON, 2000).

Cada átomo de oxigênio possui um elétron desemparelhado em sua última camada de valência, tornando-o um radical livre. A adição de um elétron ao O₂ produz o O₂⁻, ao passo que uma redução de dois elétrons do oxigênio produz o H₂O₂ (BECKMAN et al., 1990). Esta é uma reação de dismutação que acontece espontaneamente ou pode ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD).

O H₂O₂ pode romper-se facilmente na presença de íons de metais de transição para produzir o radical [•]OH (Reação de Fenton). Este radical também pode

ser gerado através da reação Haber-Weiss, onde o $O_2^{\bullet-}$ reage com o H_2O_2 (BECKMAN et al., 1990).

O $\bullet OH$ é uma das espécies químicas mais reativas conhecidas. Este radical é um forte oxidante capaz de atacar vários tipos de estruturas orgânicas, tais como, fosfolípidos e ácidos nucleicos, e está associado com a peroxidação lipídica e o dano ao DNA e proteínas (PHILLIS, 1994). O peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio, formado de uma reação não enzimática entre o óxido nítrico ($\bullet NO$) e o $O_2^{\bullet-}$, é também um potente oxidante e agente nitrativo. O $ONOO^-$ pode inibir a função da SOD (MACMILLAN-CROW et al., 1996) bem como a cadeia respiratória mitocondrial (BRORSON; SCHUMACKER; ZHANG, 1999), levando ao aumento da formação de $O_2^{\bullet-}$ e $ONOO^-$.

Em condições fisiológicas, a maior fonte de $O_2^{\bullet-}$ nas células é a perda de elétrons para as cadeias de transportes de elétrons na mitocôndria e no retículo endoplasmático (RE). O $O_2^{\bullet-}$ é gerado não somente como um produto da respiração mitocondrial, mas também pelas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH), xantina oxidase (XO) e ciclooxigenases. Flavina oxidases, localizadas nos peroxissomos, também podem produzir $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . A autooxidação de certos compostos, como o ácido ascórbico (vitamina C), os tióis (glutathione, cisteína) e a adrenalina, é uma fonte adicional de $O_2^{\bullet-}$ (CHEESEMAN; SLATER, 1993).

A produção celular de uma ERO pode levar às várias outras reações em cadeia do radical. Por exemplo, reações entre radicais e ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular podem resultar em um radical peroxil de ácido graxo ($R-COO^{\bullet}$), que pode interagir com cadeias laterais de ácidos graxos adjacentes e iniciar a produção de outros radicais lipídicos. Os radicais lipídicos produzidos nesta cadeia de reações acumulam-se na membrana celular e podem ter inúmeros efeitos sobre a função celular. Neste sentido, produtos finais da peroxidação lipídica, incluindo os aldeídos insaturados e outros metabólitos, têm propriedades citotóxicas e mutagênicas (CAI; HARRISON, 2000).

As EROs modulam uma série de processos biológicos, atuando como segundo mensageiros em cascatas de sinalização. Assim, alterações gerais ou localizadas no estado redox da célula levariam a eventos envolvidos na regulação do crescimento celular e em alterações da matriz intersticial (GRIENDLING et al. 2000), podendo o fenótipo celular ser determinado pelo ambiente redox. Dessa

forma, ambientes celulares relativamente redutores (potencial redox negativo) seriam característicos de células indiferenciadas quiescentes ou células em proliferação e, ambientes progressivamente oxidados caracterizariam quiescência por contato, diferenciação e apoptose celular (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Um evento fisiopatológico particularmente importante a respeito das EROs é a oxidação de lipídeos, em particular da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (WITZTUM; STEINBERG, 2001), um processo que é central para a formação da lesão aterosclerótica (FUKAI et al., 2002).

1.3 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A evolução dos organismos aeróbicos que sobrevivem em ambientes ricos em oxigênio requer um eficiente sistema de defesa contra as EROs, que são produzidas a partir da redução de um único elétron do oxigênio molecular para a formação de $O_2^{\bullet-}$. As concentrações fisiológicas de EROs, em organismos aeróbicos, também são benéficas e envolvem sinalização celular e sobrevivência a patógenos invasores. Enquanto um desbalanço, com concentrações elevadas de EROs e/ou diminuição de antioxidantes, pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças, tais como câncer, hipertensão, diabetes, aterosclerose e inflamação. As superóxido dismutases (SODs) são o primeiro e maior sistema de defesa de enzimas antioxidantes contra as EROs, especialmente contra os radicais ânion superóxido (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

No processo de metabolismo celular normal, o oxigênio sofre uma série de reduções univalentes, resultando na produção de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e H_2O (McCORD, 1993). Assim, os organismos aeróbicos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, incluindo enzimas para decompor peroxidases (por exemplo, catalase e glutathione peroxidase), proteínas seqüestradoras de metais de transição, e enzimas antioxidantes (como a SOD) cujo principal papel é interceptar e inativar EROs (KOJDA; HARRISON, 1999; GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000; LEWEN; MATZ; CHAN, 2000).

As SODs são componentes ubíquos dos sistemas antioxidantes celulares. Como descrito por McCord e Fridovich em 1969, estas proteínas protegem a célula do dano redox através da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a O_2 e H_2O_2 (McCORD; FRIDOVICH, 1969).

A SOD é encontrada abundantemente em todos os organismos aeróbicos, de microorganismos a plantas e animais, uma vez que os $O_2^{\bullet-}$ são tóxicos para sobrevivência celular, oxidando e degradando moléculas importantes biologicamente, tais como lipídeos e proteínas (FRIDOVICH, 1995; MCCORD, 1995).

A expressão e a atividade das SODs têm efeito nas respostas das células vasculares contra o estresse oxidativo agudo e crônico. Existem várias conseqüências funcionais da atividade enzimática da SOD. Primeira, a SOD protege contra a citotoxicidade mediada pelo $O_2^{\bullet-}$, tal como a inativação de proteínas mitocondriais ferro-sulfuradas (Fe-S). Estas interações são de grande importância, uma vez que os danos a tais complexos resultam em liberação de ferro livre e conseqüente formação de $^{\bullet}OH$ (PACKER, 2002).

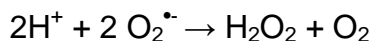
O $^{\bullet}NO$ reage com o $O_2^{\bullet-}$ três vezes mais rápido que a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALLWELL, 1995). Portanto, o balanço entre os níveis do $O_2^{\bullet-}$ e a capacidade antioxidante celular, especialmente, a SOD, regulam a atividade biológica do óxido nítrico (FUKAI et al., 2002). O $^{\bullet}NO$ dilata os vasos sanguíneos e inibe a proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMC) e a agregação plaquetária (MONCADA, 1997). Estas propriedades são anti-aterogênicas e a perda da atividade biológica do $^{\bullet}NO$ foi apontada como um fator inicial do processo aterogênico (BECKMAN et al., 1990).

Na parede do vaso, a principal isoforma da SOD é a superóxido dismutase extracelular (EcSOD) que, devido à sua localização, tem sido citada como a principal reguladora da atividade biológica do $^{\bullet}NO$ derivado do endotélio (FUKAI et al., 2002). Assim, a segunda maior função da SOD seria proteger o $^{\bullet}NO$ e a sinalização mediada pelo mesmo (GRIENDLING et al., 2000; BLANC; PANDEY; SRIVASTAVA, 2003).

A terceira conseqüência funcional da atividade da SOD é a formação de H_2O_2 , que é relativamente estável e muito difusível comparado com muitas outras EROs. Estes fatores tornam o H_2O_2 um tanto análogo ao $^{\bullet}NO$ como uma molécula sinalizadora. Por exemplo, o H_2O_2 é uma molécula sinalizadora e reguladora da expressão gênica e pode ser um importante mediador da hipertrofia da musculatura vascular em resposta a estímulos como a angiotensina II. Em combinação com alguns metais de transição como ferro ou cobre, o H_2O_2 pode reagir para formar o

$\cdot\text{OH}$, uma ERO altamente reativa, e assim produzir injúria celular via reação de Fenton (GRIENDLING et al., 2000; BLANC; PANDEY; SRIVASTAVA, 2003).

Em mamíferos, existem três isoformas da SOD (PACKER, 2002), e cada uma é produto de genes distintos, mas catalisam a mesma reação:



As isoformas da SOD são: a citosólica ou SOD cobre-zinco (CuZnSOD ou SOD-1), a SOD manganês (MnSOD ou SOD-2) localizada na mitocôndria, e uma forma extracelular da CuZnSOD (EcSOD ou SOD-3) (Figura 1).

A SOD-1 existe como um homodímero, tem peso molecular de 32 kDa e foi encontrada no citoplasma, compartimentos nucleares e lisossomas de células de mamíferos (KELLER et al., 1991; CRAPO et al., 1992; LIOU et al., 1993; BROWN; BESINGER, 1998). A SOD-2 tem o manganês como cofator e está localizada na mitocôndria de células aeróbicas (WEISIGER; FRIDOVICH, 1973); é composta por tetrâmeros de aproximadamente 21 kDa por subunidade (BARRA et al., 1984; WINTJENS et al., 2004). A SOD-3 é uma glicoproteína hidrofóbica que existe como um homotetrâmero de peso molecular 135 kDa com alta afinidade por heparina (MARKLUND, 1982), e foi detectada primeiramente no plasma humano, linfa e fluido sinovial (MARKLUND; HOLME; HELLNER, 1982). Em muitas espécies de mamíferos, a EcSOD é um tetrâmero com subunidades de 30 kDa, embora seja ocasionalmente encontrada como um dímero. A SOD-3 é secretada pelas células musculares lisas e macrófagos, e liga-se a glicosaminoglicanos na matriz extracelular vascular (MARKLUND, 1982; FUKAI et al., 2002). A expressão da SOD-3 é altamente restrita a tipos celulares específicos onde sua atividade pode exceder àquelas das SOD-1 e SOD-2 (FATTMAN et al., 2000; OURY et al., 1996).

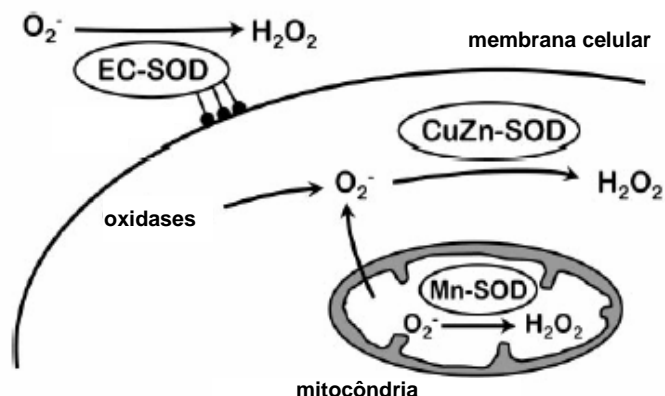


Figura 1: Esquema da localização subcelular das 3 isoformas da SOD: CuZnSOD localizada primariamente no citosol, MnSOD localizada na mitocôndria e CuZnSOD extracelular (EcSOD) (adaptado de FARACI; DIDION, 2004).

1.3.1 Isoenzimas da SOD

1.3.1.1 CuZnSOD

A isoforma CuZn da SOD parece estar presente em níveis relativamente altos em todas as células, incluindo vasos sanguíneos, onde é a isoforma predominante da SOD. Por exemplo, comparações entre resultados de ensaios em aortas de camundongos normais e deficientes de CuZnSOD indicaram que a atividade dessa isoenzima era responsável por 50% a 80% da atividade da SOD (DIDION et al., 2002; FUKAI et al., 1998, 1999, 2000). A MnSOD por aproximadamente 2% a 12% da SOD vascular, e a EcSOD pelo restante (STRALIN et al., 1995, FUKAI et al., 1998, 1999), e um comportamento semelhante a esta expressão foi observado em humanos (STRALIN et al., 1995, LANDMESSER et al., 2000).

A deficiência na CuZnSOD resulta em aumento de $O_2^{\bullet -}$ e de $ONOO^-$ vascular, aumento do tônus miogênico, resposta vasoconstritora aumentada, e diminuição do relaxamento do endotélio (mediado pelo $^{\bullet}NO$) em artérias de grosso calibre e micro vasos (DIDION et al., 2002; COOKE; DAVIDGE, 2003).

A expressão da CuZnSOD em células vasculares pode ser alterada sob diversas condições. Por exemplo, níveis de CuZnSOD mostraram-se maiores em algumas artérias de fêmeas (LAUGHLIN et al., 2003) e também poderiam aumentar com a idade (GUO et al., 2001). A expressão da enzima estaria aumentada no endotélio pelo *shear stress in vitro* (INOUE et al., 1996) e pelo exercício (RUSH;

TURK; LAUGHLIN, 2003), mas também poderia ser sub-regulada *in vivo* em regiões vasculares com distúrbio de fluxo sanguíneo (PASSERINI et al., 2004). Estudo com camundongos transgênicos sugeriu que a superexpressão de CuZnSOD preveniria efetivamente o aumento de superóxido vascular e atenuaria o aumento na pressão arterial em resposta à angiotensina II (WANG et al., 2002).

1.3.1.2 MnSOD

Sob condições normais, a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons é a maior fonte de $O_2^{\bullet-}$, convertendo até 5% do O_2 em $O_2^{\bullet-}$. Devido à sua localização subcelular, a MnSOD foi considerada a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, pois sua deficiência em camundongos implicou em morte prematura com uma variedade de fenótipos, incluindo neurodegeneração, anormalidades cardíacas e dano mitocondrial extensivo (PACKER, 2002).

Doenças associadas com estresse oxidativo vascular podem alterar a expressão da MnSOD. Por exemplo, no tecido vascular, lipopolissacarídeos e citocinas pró-inflamatórias aumentaram a produção de $O_2^{\bullet-}$ e a expressão da MnSOD (MACMILLAN-CROW; CRUTHIRDS, 2001; SUZUKI et al., 1993; VISNER et al., 1992; RUETZLER et al., 2001). A expressão vascular do mRNA para CuZnSOD e MnSOD alterou-se em um modelo temporal durante a aterosclerose em camundongos deficientes em Apo-E (inicialmente aumentava, e então diminuía com o tempo) (t HOEN et al., 2003). Em tecidos não vasculares (homogenato de rins de ratos), a angiotensina II aumentou os níveis de MnSOD, mas também diminuiu sua atividade causada pela nitração de proteína induzida por peroxinitrito (GUO et al., 2003). A inativação da MnSOD pelo $ONOO^-$ é potencialmente uma questão chave, já que o $ONOO^-$ aumentou, dentro dos vasos sanguíneos, durante várias condições incluindo a inflamação, a diabetes, a hipertensão, a aterosclerose, e a hemorragia subaracnóide (BALLINGER et al., 2002).

A superexpressão de MnSOD, usando a transferência viral e lipossomal mediada por genes, produziu efeitos benéficos em vários modelos de doença vascular. Usando esta via, a superexpressão da enzima reduziu a quantidade de $O_2^{\bullet-}$ e melhorou a função endotelial na hipercolesterolemia e na diabetes (ZANETTI et al., 2001a,b; LI et al., 2003).

1.3.1.3 EcSOD

A EcSOD é uma CuZnSOD extracelular secretória descoberta por Marklund (1982), e presente na superfície de muitas células. Esta isoforma é um importante componente da SOD na parede do vaso, e foi mostrado que abrangeria até metade da atividade da SOD vascular (STRALIN et al., 1995).

Como uma enzima contendo cobre, a EcSOD é regulada pela disponibilidade desse íon. O cobre livre intracelular é extremamente limitado (RAE et al., 1999), e proteínas transportadoras solúveis (chaperonas de cobre) são usadas para levar o metal até as proteínas que os contém. A chaperona que disponibiliza o cobre para a EcSOD e regula sua atividade é chamada proteína antioxidante-1 (Atox-1) (JENEY et al., 2005).

A EcSOD é sensível à altas temperaturas, pH extremo, e altas concentrações de uréia, e pode ser inibida por muitos agentes como azida e inativada por dietilditilcarbamato e H_2O_2 (NOZIK-GRAYCK; SULIMAN; PIANTADOSI, 2005). A SOD-3 é a única isoforma expressa extracelularmente, ligando-se ao tecido via seu domínio heparina ligante que promove a afinidade da proteína pelos proteoglicanos heparan-sulfato na superfície celular, em membranas basais e na matriz extracelular (MARKLUND, 1984; OURY et al., 1996). A isoenzima está localizada por toda a parede do vaso, particularmente entre o endotélio e o músculo vascular (STRALIN et al., 1995; OURY; DAY; CRAPO, 1996; FUKAI et al., 2002).

Ao contrário de alguns tecidos como o cérebro (CHAN, 2001), a EcSOD perfaz a maior porção da atividade da SOD nos vasos sanguíneos (STRALIN et al., 1995; FUKAI et al., 2000; LANDMESSER et al., 2000; LEITE et al., 2003). A expressão da EcSOD em células vasculares e no interior da parede do vaso pode ser alterada em resposta a vários estímulos, incluindo a angiotensina II, o óxido nítrico e a homocisteína, bem como durante a hipertensão, aterosclerose e diabetes (FUKAI et al., 1998, 1999, 2002; LANDMESSER et al., 2000; ZELKO et al., 2002; FATTMAN; SCHAEFER; OURY, 2003; NONAKA et al., 2001). Em contraste com a CuZnSOD, a expressão da EcSOD tem sido relatada como aumentada em regiões da vasculatura com distúrbios de fluxo sanguíneo (PASSERINI et al., 2004).

A expressão da proteína e do mRNA para EcSOD é diferente da CuZnSOD e MnSOD, uma vez que é célula-específica e órgão-específico, sendo proeminente no coração, pulmão, vasos sanguíneos, placenta e rins. Altos níveis do mRNA mostraram-se presentes nas células alveolares tipo II, células tubulares renais

proximais, macrófagos do pulmão, células musculares lisas vasculares, algumas linhagens de fibroblastos, células da glia e células endoteliais (NOZIK-GRAYCK; SULIMAN; PIANTADOSI, 2005).

A EcSOD foi citada como o maior determinante da biodisponibilidade do \bullet NO nos vasos sanguíneos (FUKAI et al., 2002). Neste sentido, os efeitos da deficiência da EcSOD e CuZnSOD sobre a função endotelial podem ser similares (DIDION et al., 2002; COOKE; DAVIDGE, 2003; JUNG et al., 2003). Portanto, para proteger o \bullet NO durante toda a sua rota de difusão (do sítio de produção, no endotélio, até seu alvo no músculo vascular), a expressão de ambas as enzimas pode ser essencial (FARACI; DIDION, 2004).

1.4 Estresse Oxidativo e Lesão Vascular

Pequenas quantidades de EROs são indispensáveis em muitos processos, incluindo sinalização intracelular, defesa contra microorganismos e função celular. Em contraste, a produção excessiva e/ou remoção inadequada das EROs, ultrapassando os mecanismos de defesa antioxidantes endógenos, tem sido implicada em processos de oxidação de macromoléculas biológicas, tais como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos, sendo esta condição comumente referida como estresse oxidativo (FUKAI et al., 2002).

Evidências sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido na patogênese de muitas doenças cardiovasculares, como hipercolesterolemia, aterosclerose, hipertensão, diabetes, falência cardíaca, além de centenas de outras patologias (CAI; HARRISON, 2000; FUKAI et al., 2002).

A produção de superóxido está aumentada após a injúria por balão, especialmente nas células musculares lisas da camada média e neoíntima, e em fibroblastos da adventícia. Como foi demonstrado que a formação da neoíntima pode ser inibida por antioxidantes, as EROs parecem ser funcionalmente importantes no remodelamento vascular após a lesão (AZEVEDO et al., 2000; REY; PAGANO, 2002). Além disso, outros estudos também mostraram um papel para a oxidase dependente de NADPH, imediatamente após a injúria, bem como após a formação da neoíntima (SZOCS et al., 2002; PAGANO, 2001).

Apesar do seu potencial em induzir injúria vascular, tem sido atribuído às EROs um importante papel sinalizador em situações fisiológicas e patológicas

(IRANI, 2000). A importância da sinalização celular dependente do estado redox vascular foi evidenciada em ensaios para avaliação de crescimento, apoptose e senescência (ABE; BERK, 1998; SUSUKI; FORMAN; SEVANIAN, 1997; SEM; PACKER, 1996; KUNSCH; MEDFORD, 1999). Alguns autores demonstraram que as células adventícias, endoteliais e musculares lisas expressavam ao menos algumas das subunidades de oxidases fagocíticas dependentes de NADPH, gerando superóxido e outras EROs em resposta a uma variedade de estímulos (IRANI, 2000; GRIENDLING et al., 2000). Outros mostraram que após uma injúria vascular aguda ocorria geração de EROs e apoptose maciça, que foram anuladas por antioxidantes com grupamentos sulfidrilas (IRANI, 2000; MESSMER; BRINER; PFEILSCHIFTER, 1999; TERADA, 2002).

Como mencionado anteriormente, as SODs, especialmente a EcSOD, são os maiores reguladores da biodisponibilidade do NO na parede do vaso (FUKAI et al., 2002). Após a injúria, foi verificada uma super-regulação do mRNA da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (YAN; HANSSON, 1998), mas não ficou claro se tal resposta era protetora ou levava à formação de espécies reativas deletérias. Leite e col. (2003) examinaram em detalhes a ocorrência da baixa atividade da SOD e seu papel fisiopatológico no reparo e calibre vascular após lesão por balão. E ainda, exploraram a interação entre a atividade da SOD, o estresse nitrativo e o sistema NO/NOS. Embora houvesse depleção em ambas as SODs, citoplasmática e extracelular, após a injúria os autores mostraram que a administração de EcSOD foi suficiente para normalizar a atividade da SOD e melhorar o calibre vascular, atribuindo uma importância particular a esta isoforma (LEITE et al., 2003).

1.5 PrP^C e Defesa Antioxidante

Existem evidências que apontam o papel funcional da PrP^C no metabolismo do Cu²⁺ (BROWN, 2001), devido a sua forte ligação à região *octarepeat* da proteína (BROWN et al., 1997a). Além do envolvimento no metabolismo do cobre, foi sugerida a atuação da PrP^C na proteção contra o estresse oxidativo (BROWN et al., 1997b). Ao investigar o significado fisiológico dessa associação, Klamt e col. (2001) demonstraram, em músculo esquelético, coração e fígado de camundongos *knockout* para PrP^C, o aumento da oxidação lipídica e protéica em associação com a

diminuição da atividade da enzima catalase, sugerindo uma função da PrP^C também no estresse oxidativo de outros órgãos (KLAMT et al., 2001).

Brown e col. (1997a) verificaram que extratos de cérebro de camundongos *knockout* para PrP possuem, substancialmente, menor conteúdo de Cu²⁺ comparado a camundongos normais. Sendo assim, a habilidade da PrP em ligar-se ao Cu²⁺ seria influenciada pelo conteúdo local do íon. Ademais, a atividade de enzimas dependentes de Cu²⁺ foi reduzida, sugerindo que a PrP possuía uma função de metaloproteína ou de suprimento às enzimas que necessitassem de tais íons (BROWN et al., 1997a).

Vários estudos sugerem que a PrP age protegendo as células da atividade redox deletéria do cobre não complexado (BROWN; SCHMIDT; KRETZSCHMAR, 1998; RACHIDI et al., 2003). Camundongos *knockout* para PrP comparados com normais, exibiram significativo aumento na oxidação de lipídeos e proteínas, bem como perda de função da SOD e da catalase (KLAMT et al., 2001).

Desta forma, a alteração das condições fisiológicas da PrP^C poderia implicar não somente em doenças neurodegenerativas, mas também na ocorrência de outras como o infarto do miocárdio (lesão de reperfusão cardíaca), a insuficiência hepática e a sepse, entre outras (MARTINS et al., 2002). Células sem a presença de PrP^C teriam o conteúdo diminuído de Cu²⁺ e menor atividade da SOD, comparado às células normais (BROWN et al., 1997a,b). Contudo, o efeito da expressão da PrP^C em função da concentração de Cu²⁺ seria questionável, uma vez que a mesma poderia servir como um sensor, seqüestrador ou transportador deste metal (BROWN et al, 1997a,b; WAGGONER et al., 2000). Na ausência de estresse, a afinidade da PrP^C por íons metálicos seria menor do que a de outras proteínas ligadoras de Cu²⁺ e Zn²⁺. No entanto, esta afinidade poderia ser aumentada pela presença de glicosaminoglicanos (GONZALEZ-IGLESIAS et al., 2002).

O mecanismo para o efeito antioxidante da PrP^C não está claro, podendo decorrer do aumento da atividade das SODs endógenas ou de seu papel no metabolismo do Cu²⁺ (BROWN; BESINGER, 1998).

Os trabalhos publicados a respeito da PrP^C foram realizados, basicamente, com células cerebrais. No presente estudo, a hipótese de que a alteração dos níveis de PrP^C contribuiria para induzir a diminuição sustentada da atividade da SOD na parede vascular e estimular o remodelamento negativo após lesão teve base em estudos preliminares, por imunohistoquímica, realizados no Laboratório de Biologia

Vascular do InCor/FMUSP, para avaliar a expressão da PrP^C em artérias ilíacas intactas de coelhos ou logo após a lesão por balão.

As informações obtidas indicaram que existe uma significativa expressão da PrP^C em vasos normais, com diminuição desta expressão imediatamente após a lesão. Além disso, somou-se a estes resultados o conhecimento de que o padrão de expressão das proteínas CuZnSOD e EcSOD, observado no estudo de Leite e col. (2003), foi semelhante ao padrão de expressão do mRNA destas proteínas no cérebro de camundongos *knockout* para a PrP^C (BROWN; NICHOLAS; CANEVARI, 2002).

Considerando a exposição das células musculares lisas ao ambiente oxidativo produzido no processo da lesão aterosclerótica, a associação destes resultados nos moveu a realizar o presente estudo quanto ao envolvimento da PrP^C no metabolismo do Cu²⁺ e sua possível atividade SOD-*like* frente ao estresse oxidativo.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a expressão da PrP^C, presente em células vasculares, sofre indução por estímulos químicos (angiotensina II, tunicamicina, 7-cetocolesterol) e mecânico (lesão por cateter balão), que desencadeiam o estresse do retículo endoplasmático, e avaliar seu envolvimento na atividade da SOD.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a atividade da SOD em células musculares lisas de aorta de coelhos (RASM), por ensaio cinético espectrofotométrico;
- Determinar as concentrações de cobre em células RASM, por espectroscopia de absorção atômica;
- Determinar a expressão das isoenzimas da SOD em células RASM, por *western blotting*;
- Avaliar a expressão da PrP^C em células RASM, por *western blotting*;
- Avaliar a transcrição do mRNA para PrP^C em células RASM, por Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR);
- Avaliar a transcrição do mRNA para PrP^C, em artérias angioplastadas de coelhos, por RT-PCR .

MATERIAIS E MÉTODOS

3 METODOLOGIA

Os protocolos utilizados tiveram como base as referências dos seguintes autores: IMLAY; FRIDOVICH, 1991; DHANABAL et al., 1999, JANISZEWSKI et al., 1998, 2004; AZEVEDO et al., 2000; LAURINDO et al. 2002.

3.1 Reagentes utilizados para estímulo celular

As células foram submetidas a diferentes estímulos que desencadeiam o estresse do retículo endoplasmático (RE), a citar: angiotensina II (Calbiochem®) 100 nM, tunicamicina (Calbiochem®) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (Sigma-Aldrich®) 5 µg/mL. Os veículos para diluição dos estímulos utilizados no estudo foram os seguintes: água deionizada para a angiotensina II, dimetilsulfóxido (DMSO, Amresco®) para a tunicamicina e etanol (Merck®) para o 7-cetocolesterol.

A escolha dos agentes estressores do RE justifica-se nos efeitos celulares produzidos. A angiotensina II é um agonista da NAD(P)H oxidase que promove um aumento da produção de superóxido (GRIENDLING et al., 1994). A tunicamicina é um inibidor específico da N-glicosilação de proteínas, um processo observado apenas no RE, indicando que este agente é um indutor do estresse do RE altamente específico (OKADA et al., 2004). E o 7-cetocolesterol (oxiesterol) exerce efeitos deletérios sobre as células musculares lisas (SMCs) vasculares, por meio da estimulação da produção de EROs (LIZARD et al., 1998) e a indução de apoptose (LIZARD et al., 1999), dois eventos importantes na aterogênese.

3.2 Cultura celular

As células musculares lisas de aortas de coelhos (RASM) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Eduardo Krieger, do laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração da FMUSP. Esta é uma linhagem celular estabelecida e imortalizada por seleção pelo Professor Vincenzo Buonassisi, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

As células foram semeadas em placas de cultura de 10 cm² contendo 5,0 mL de meio completo F-12 Coon's com penicilina (100 U/mL)/streptomicina (100 µg/mL), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), e mantidas em estufa (THERMO 3110) a 37 °C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3

dias, até que as culturas, quando observadas ao microscópio de contraste de fase (AXIOVERT 25, Zeiss®), apresentassem o número de células exigido para os experimentos (aproximadamente 90% de confluência). A partir deste momento as culturas foram retiradas da estufa, acrescidas dos estímulos nas concentrações citadas no item 4.1 e levadas de volta à estufa por períodos de tempo diferenciados (4, 8 e 18 horas). Foram preparadas 3 culturas para cada estímulo, bem como para o controle (sem estímulo), semeadas em dias diferentes. Também avaliamos um grupo de culturas apenas com o etanol, para observar o comportamento das células frente a este veículo.

O meio de cultura completo F-12 Coon's, o soro fetal bovino (FBS), a solução de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) foram obtidos da Gibco BRL-Life® Technologies Grand Island, NY, USA.

3.3 Preparo do homogenato de células

As células RASM (90% de confluência) foram lisadas com 200 µL de tampão de lise (20 mM Hepes; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 1% Triton; 1 mM EGTA e 1,5 mM MgCl₂) acrescido de inibidores de proteases (Aprotinina 1µg/mL, Leupeptina 1µg/mL e Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1mM) seguidos de exposição a três ciclos de 10 segundos de ultra-som (Sonic Dismembrator 60, Fisher Scientific®). As amostras foram centrifugadas (10 minutos, 12000 g, 4 °C) para a remoção dos *debris* celulares. O sobrenadante foi utilizado como homogenato protéico total. A concentração de proteínas foi determinada utilizando o conjunto reagente da BioRad®, através do método Bradford.

O coquetel de inibidores de protease (Aprotinina, Leupeptina e PMSF) foi adquirido da Calbiochem/Merck® (Darmstadt, Germany); os demais reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma Chemical® (Saint Louis, Missouri, USA), diluídos e estocados conforme as instruções do fabricante.

3.4 Determinação da atividade total da enzima SOD

A atividade total da SOD foi determinada espectrofotometricamente através do método da inibição da redução do ferrocitocromo *c* pelo O₂•⁻, gerado pelo sistema xantina/xantina-oxidase, em 550 nm (Espectrofotômetro Hitachi U-2001) (FLOHÉ; OTTING, 1984). Uma Unidade arbitrária de enzima (U) é definida como a quantidade

de SOD capaz de diminuir em 50% a velocidade de inibição da redução do citocromo c. Os valores para a atividade total da SOD (n=3) foram expressos como Unidades arbitrárias por miligrama de proteína (U/mg). Os resultados obtidos nas determinações foram analisados em planilhas do Software Origin® e Microsoft Excel® para efeitos de cálculos de médias e desvios padrão.

Para o ensaio, foram preparadas duas soluções: a solução (A) contendo 0,5 mM de Xantina (Calbiochem®); 0,02 M de citocromo c (Sigma-Aldrich®) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,8) e EDTA 0,1 mM (solução estável por 3 dias a 4 °C). A reação foi iniciada com a adição de 15 µL da solução B, a qual continha 0,2 UI/mL de Xantina Oxidase (Calbiochem®) em 2,5 mL do mesmo tampão fosfato. Essa concentração foi suficiente para que a velocidade de redução do citocromo c no sistema sem a SOD (branco) fosse igual a 0,025 unidade de absorbância por minuto.

A absorbância (550 nm) foi acompanhada por 180 segundos a 37 °C, e para o cálculo da atividade da SOD foi utilizado o trecho mais linear dentro do tempo de reação.

A determinação do valor de atividade total para a SOD foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 1 - \frac{\Delta A \text{ amostra}}{\Delta A \text{ da SOD na solução B}} \times 100$$

onde, ΔA amostra corresponde a variação de absorbância (absorbância final – absorbância inicial) medida para a amostra; e ΔA da SOD na solução B, corresponde à variação de absorbância da atividade para SOD obtida a partir da solução B.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ UI SOD} \text{ ----- } 50\% \text{ de inibição} \\ X \text{ ----- } \% \text{ de inibição} \\ \text{Atividade SOD} = X \text{ U/mg de proteína da amostra} \end{array}$$

3.5 Determinação das concentrações de cobre (Anexo I)

As amostras de homogenatos celulares foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Químicas e Ambiental do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) no Centro de Química e Meio ambiente – CQMA da USP, onde procedeu

a análise das concentrações de cobre através de espectroscopia de absorção atômica (AAS – Forno de Grafite), sob registro geral número 81 a 96/07.

3.6 Western Blotting

Os *western blotting* das proteínas CuZnSOD, MnSOD, EcSOD e PrP^C nas amostras de homogenatos celulares em presença dos três estímulos (angiotensina II, tunicamicina e 7-cetocolesterol) foram realizados em um *pool* de 3 culturas de células RASM semeadas em dias diferentes.

As proteínas dos lisados celulares (alíquotas de 30 µg de proteína para as isoenzimas SOD e 80 µg para PrP^C, por canaleta) foram diluídas (3:1 v/v) em tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,02 % (Sigma-Aldrich[®]), mercaptoetanol 10 mM (Sigma-Aldrich[®]) e dodecil sulfato de sódio (SDS, BioRad[®]) 10 %. Essas amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100 °C para desnaturação das proteínas e quebra de pontes dissulfeto. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) 17,5% (CuZnSOD), 15% (EcSOD e PrP^C), e 12% (MnSOD), em condições redutoras e submetidas à corrente elétrica contínua de 50 mA por 90 minutos para separação eletroforética das proteínas. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech[®], USA) através de sistema *semi-dry* (0,8 mA/cm² de membrana), por 1 hora.

As membranas foram bloqueadas com tampão Tris salina (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 e NaCl 150 mM) contendo 0,05% de Tween 20 (TBST), e leite desnatado 5%, por duas horas. Posteriormente, foram incubadas *over night* em TBST com leite desnatado 1% contendo anticorpo primário produzido em camundongo (anti-PrP^C, 1:200, gentilmente fornecido pela Dra. Vilma Regina Martins do Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer/SP), ou em ovelha (anti-CuZnSOD, 1:1000 adquirido da Oxis International Inc.[®]), ou em coelho (anti-MnSOD 1:800 e anti-EcSOD 1:800, adquiridos da Stressgen[®], Victoria, Canada). Após a retirada do anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes (15 minutos) com TBST para remoção do anticorpo residual presente, e, em seguida, as mesmas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário *goat anti-rabbit IgG* (Stressgen[®], Victoria, Canada) 1:2000 para MnSOD e EcSOD, secundário *rabbit anti-sheep* (Calbiochem[®]) 1:2000 para CuZnSOD, e *rabbit anti-mouse IgG* (Amersham Pharmacia Biotech[®], USA) 1:600

para PrP^C, conjugados com peroxidase. A revelação foi feita por quimiluminescência, utilizando conjunto reagente ECL (Amersham Pharmacia Biotech[®], USA) e as membranas foram expostas, em câmara escura, ao filme fotográfico durante diferentes tempos.

As intensidades das bandas foram medidas utilizando-se o *software* Scion Image[®] e os resultados analisados no programa GraphPad Prism[®] versão 3.01.

O controle para a expressão de proteínas nos ensaios de *western blotting* foi realizado com anticorpo primário monoclonal anti- β -actina (IgG de camundongo, da Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), na concentração de 1:10000, e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech[®], USA), na concentração de 1:20000, nas mesmas condições da reação realizada para PrP^C e para as isoenzimas da SOD. As membranas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo primário e por 1 hora com o anticorpo secundário. A revelação foi feita por quimiluminescência, utilizando conjunto reagente ECL (Amersham Pharmacia Biotech[®], USA).

A PrP^C nos ensaios de *western blotting* aparece na altura de 30-35 kDa, a CuZnSOD em 16 kDa, a MnSOD em 25-30 kDa e a EcSOD em 32 kDa, comparadas ao padrão de peso molecular aplicado no gel SDS-PAGE. Os resultados apresentados, da expressão das proteínas PrP^C, CuZnSOD, MnSOD e EcSOD, foram corrigidos pela expressão da β -actina (42 kDa).

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR)

Todos os reagentes utilizados para a RT-PCR e o Trizol[®] (utilizado para extração do RNA) foram comprados da Invitrogen[®] com qualidade para Biologia Molecular, enquanto os demais reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma Chemical[®] (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), diluídos e estocados conforme as instruções do fabricante.

O RNA total foi extraído a partir de cultura de células RASM, com aproximadamente 90% de confluência. Para o grupo controle e para cada estímulo utilizado foram feitas três culturas de células RASM, em dias diferentes.

As reações foram realizadas no termociclador Eppendorf[®] Mastercycle Personal.

Extração e Precipitação do RNA das células RASM em cultura

Quando as células RASM atingiram 90% de confluência, o meio de cultura foi retirado por inversão e as células presas à placa foram lavadas três vezes com tampão salina fosfato (PBS) gelado. Após a retirada do excesso de PBS, a cada placa de células foi adicionado 1 mL de Trizol[®], e esta mistura foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, a mistura de células e Trizol[®] foi colocada em um tubo e adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Merck[®]). Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos e incubados por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. A mistura contida nos tubos foi centrifugada (12000 g) por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa, que contém o RNA, foi transferida para outro tubo.

O RNA contido na fase aquosa foi precipitado durante 10 minutos à temperatura ambiente com 0,5 mL de álcool isopropílico 100% (Merck[®]), e, em seguida, os tubos foram centrifugados (12000 g, 10 minutos, 4 °C) para a separação do RNA. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado (*pellet* de RNA) foi adicionado 1,0 mL de etanol (Merck[®]) 75%. A mistura foi congelada à temperatura de -80 °C, até a quantificação e verificação da integridade do RNA e realização da RT-PCR.

Quantificação do RNA

As amostras de RNA mantidas a -80 °C foram descongeladas e centrifugadas (7500 g, 5 minutos, 4 °C). O etanol 75% foi removido e o *pellet* de RNA foi secado (evaporação do excesso de etanol) à temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. O RNA foi ressuspensionado em 30 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato) inativa 0,01%. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Hitachi[®] U-2001) e o critério utilizado para a análise da amostra de RNA foi a razão DO_{260}/DO_{280} de 1,6 a 1,8 (SAMBROOK, 2001). A concentração foi obtida em ng/µL, e foram utilizados para leitura no espectrofotômetro, 5 µL de amostra de RNA para 95 µL de água DEPC.

Integridade do RNA

A integridade das amostras de RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (Amresco[®]) 0,8%, para visualização das bandas 18S e 28S feita em um transluminador (Eagle Eye II[®], Alpha Innotech), em presença de brometo de etídio (1 mg/mL).

A mistura submetida à eletroforese foi composta de 1 µg de RNA (aproximadamente 1 µL de amostra), 9 µL de água DEPC e 2 µL tampão de amostra 6X (azul de bromofenol 0,25 %, xileno cianol FF 0,25% e glicerol 30% em H₂O). A agarose (0,4 g) foi dissolvida em 50 mL de tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M e EDTA 0,002 M) por aquecimento (aproximadamente 1 minuto). Quando o gel atingiu a temperatura de aproximadamente 50 °C, foram adicionados 25 µL de brometo de etídio (1 mg/mL) e a mistura foi homogeneizada. O gel foi vertido em suporte próprio, dentro da cuba para eletroforese, e após a sua polimerização, as amostras de RNA foram aplicadas individualmente nos poços marcados no gel. O gel foi coberto com tampão TAE 1X para a corrida eletroforética (80 a 90 mV, por aproximadamente 25 minutos). Após a corrida, o gel foi fotografado por exposição à luz UV no transluminador Eagle Eye II®.

Reação de Transcrição Reversa (RT)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), através da reação de transcrição reversa (RT), foram utilizados 2 µg de RNA de cada uma das amostras. Os compostos utilizados para reação foram: sonda de oligonucleotídeo deoxitimidina (Oligo dT 0,5 µg/µL), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP mix 10 mM), tampão 5X, ditioneitol (DTT, 0,1 M), RNase (40 U/µL) e a enzima transcriptase reversa (Superscript II®, 200 U/µL).

A reação foi iniciada com o aquecimento (65 °C, 5 minutos) das amostras contendo o RNA, 1 µL de Oligo dT (0,5 µg/µL), 1 µL de dNTP (mix 10 mM) e água DEPC em quantidade suficiente para completar 12 µL. Em seguida, a mistura foi colocada no gelo para o choque térmico. Foram adicionados 4 µL de tampão padrão I 5X (5x first strand buffer), 2 µL de DTT 0,1 M e 1,0 µL de RNase 40 U/µL e a mistura foi incubada por 2 minutos a 42 °C. Na sequência, foi acrescentado 1 µL da enzima Superscript II® (200 U/µL) a cada tubo de amostras, e estes foram incubados a 42 °C durante 50 minutos no termociclador. Após este período de incubação, a inativação da enzima foi feita por aquecimento a 70 °C por 15 minutos.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada com um volume final de 25 µL, composto por 1 µL de cDNA; 2,5 µL de tampão para PCR 10X (PCR buffer 10x); 0,5 µL de dNTP 10 mM; 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM; 1,0 µL de cada iniciador da PrP^C a 10 µM (sense: **CAC**

CAA AGG GGA GAA CTT CA e anti-sense: **ATC CCA CGA TCA GGA AGA TG**); 0,2 µL de Taq DNA polimerase 10 µM e 18,05 µL de água deionizada.

As amostras foram colocadas no termociclador, e como controle negativo da reação foi utilizada a mistura dos compostos para a reação sem o cDNA.

Após um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, os ciclos subsequentes foram: desnaturação, 1 minuto a 94 °C; anelamento, 1 minuto a 55 °C; e extensão, 1 minuto a 72 °C. Seguiram-se 30 ciclos e, por fim, a temperatura foi mantida a 4 °C até a retirada das amostras do termo ciclador.

O produto da PCR (10 µL de cada amostra) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (1,0 g de agarose em 50 mL de TAE 1X) contendo 25 µL de brometo de etídio (1,0 mg/mL), para visualização da amplificação do cDNA para PrP^C (185 pb). Após a eletroforese (80 a 90 mV, por aproximadamente 25 minutos), o gel foi fotografado por exposição à luz UV no transluminador Eagle Eye II®, as intensidades das bandas foram medidas utilizando-se o *software* Scion Image® e os dados analisados no programa GraphPad Prism® versão 3.01.

Como controle positivo para a presença do cDNA na amostra, foi utilizado a amplificação dos iniciadores específicos para o gene GAPDH de coelho (sense: **TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA** e anti-sense: **CAC AAT GCC GAA GTG GTC GT**). As condições da reação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos subsequentes de desnaturação (1 minuto, a 94 °C), anelamento (1 minuto, a 57 °C) e extensão (1 minuto, a 72 °C). Por fim, a temperatura foi mantida a 4 °C até a retirada das amostras do termociclador. O produto da reação (293 pb) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio 1,0 mg/mL, e visualizado após a exposição à luz UV, no transluminador Eagle Eye II®.

3.8 Angioplastia de artéria ilíaca de coelho

O modelo do estudo foi o de lesão arterial por cateter balão em artéria ilíaca de coelho. Os animais (machos albinos da raça New Zealand, pesando entre 2,5 a 3,5 Kg) foram adquiridos de criadores independentes e mantidos no biotério do Serviço de Fisiologia Aplicada do Instituto do Coração da FMUSP, sob ciclo claro/escuro de 12h, em temperatura controlada em torno de 25°C com água e dieta comercial para cunicultura *ad libitum*.

Os coelhos foram submetidos à sedação intramuscular com cloridrato de S(+) ketamina (Cristalia[®]) 35-50 mg/kg e 3,5 mg/kg de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum-Bayer[®]) para realização dos preparativos para o procedimento. Posteriormente, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (25 mg/Kg) via endovenosa (v.e.) e colocados em decúbito dorsal. Uma dose de gentamicina foi injetada por v.e. e, em seguida, a artéria ilíaca direita foi isolada e exposta 4-5 cm distalmente ao ligamento inguinal. Uma dose de heparina não fracionada foi administrada em por v.e. (250 U/Kg), 10 minutos antes da introdução de um cateter balão para angioplastia coronária.

As dimensões do balão eram 20,0 mm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro, quando insuflado. O cateter foi introduzido retrogradamente por 8,0-9,0 cm até a origem da artéria ilíaca direita. A lesão arterial foi provocada pela insuflação do balão, com séries de três insuflações de 8,0 atmosferas durante 30 segundos, com 15 segundos de intervalo entre cada insuflação; após cada série de insuflações, o balão foi posicionado 20 mm distalmente ao local da série anterior, e todo o procedimento repetido até completar um total de três séries de insuflações.

Após a lesão, a artéria ilíaca direita foi ligada. Os animais receberam penicilina-benzatina e gentamicina intramuscular, e foram levados de volta ao biotério para um período de sobrevida de 7 e 14 dias. Ao término destes períodos, os coelhos foram sacrificados com excesso de pentobarbital e a artéria ilíaca direita lesada foi retirada imediatamente. A artéria contra-lateral (ilíaca esquerda, sem lesão) também foi retirada. Além destes dois grupos, houve um terceiro (“tempo zero”), em que o animal foi sacrificado imediatamente após a angioplastia. O intervalo de tempo entre a angioplastia e o início da retirada do fragmento da artéria lesada dos coelhos do grupo “tempo zero” foi de, aproximadamente, 10 minutos. A artéria contra-lateral foi retirada logo após a lesada.

O procedimento foi realizado em 2 animais para cada grupo com sobrevida de 7 e 14 dias e “tempo zero”. Como controles negativos foram utilizadas as duas artérias ilíacas retiradas de um coelho não submetido previamente a qualquer lesão.

Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética e Científica da Instituição – InCor/FMUSP (Protocolo SDC nº 2333/03/127 da sessão 439/03/18 de 06/11/2003).

Após a remoção cirúrgica das artérias, os fragmentos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido, macerados em gral com pistilo e, posteriormente,

transferidos para um tubo livre de RNase. A extração do RNA e os demais procedimentos até a obtenção do produto da PCR foram realizados da mesma maneira que descrito para as culturas de células RASM (item 4.7).

RESULTADOS

4 Resultados

A atividade basal (controle) da SOD foi de $13,9 \pm 1,2$ U/mg de proteína. O estresse do RE levou a uma significativa diminuição na atividade da SOD após a incubação das células por 4 horas com tunicamicina (~ 29%) e 7-cetocolesterol (~ 12%), por 8 horas com tunicamicina (~ 37%), por 18 horas com angiotensina II (~ 42%) e 7-cetocolesterol (~ 32%). Um aumento significativo da atividade da SOD foi observado para as células incubadas por 8 horas com angiotensina II (~ 41%) (Figura 2).

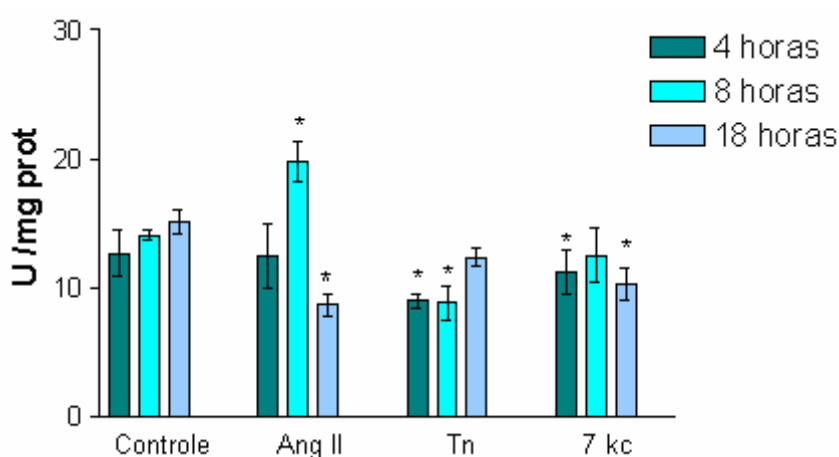


Figura 2: Atividade da SOD (U/mg de proteína) em homogenato de células RASM (n=3) estimuladas por 4, 8 e 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. *p < 0,05

4.2 Determinação das concentrações de cobre

As amostras de homogenatos celulares foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Químicas e Ambiental do IPEN no Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) da USP, onde se procedeu à análise das concentrações de cobre nas referidas amostras através de AAS – Forno de Grafite (Anexo I).

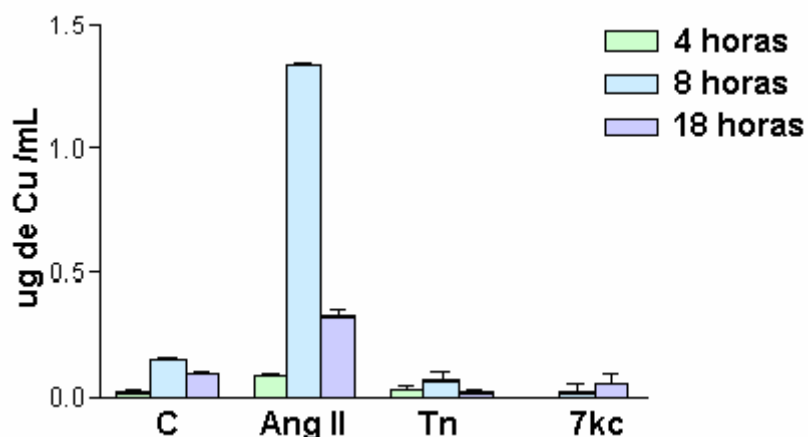


Figura 3: Concentração de cobre ($\mu\text{g/mL}$) no *pool* de 3 amostras de cultura de células RASM nos diferentes tempos de incubação (4, 8 e 18 horas) com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 $\mu\text{g/mL}$ e 7-cetocolesterol (7kc) 5 $\mu\text{g/mL}$.

Nas amostras incubadas com angiotensina II por 8 horas, observou-se um aumento de, aproximadamente, 9 vezes na concentração de cobre em comparação ao controle. Para o mesmo estímulo, com incubação de 18 horas o aumento foi de aproximadamente 3,7 vezes (Figura 3).

4.3 Western blotting

A Figura 4 mostra a expressão da CuZnSOD nas células RASM incubadas com os diferentes estímulos por 4 horas, corrigida pela expressão da β -actina nas mesmas amostras. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 78,8% para Ang II, 78,0% para Tn e 74,2% para 7kc.

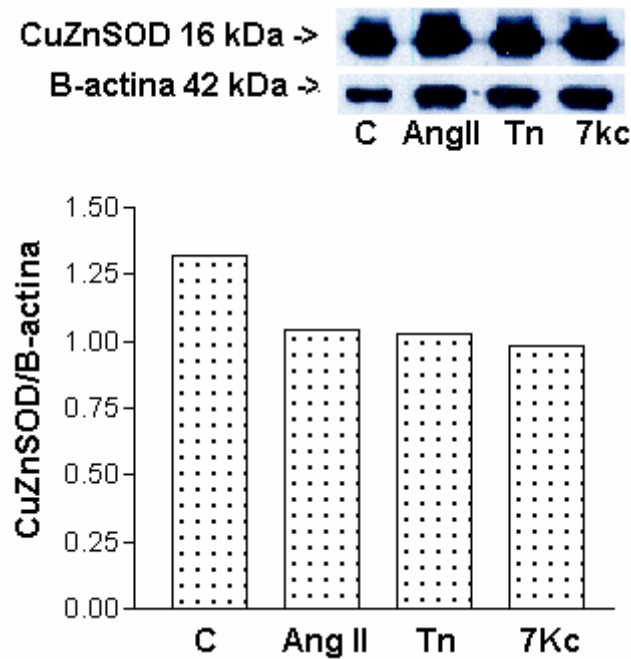


Figura 4: Análise de *western blotting* para expressão da CuZnSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 4 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

A expressão da CuZnSOD para as amostras de células incubadas por 8 horas, com os diferentes estímulos está representada na Figura 5. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 101,1% para Ang II, 124,2% para Tn e 123,1% para 7kc.

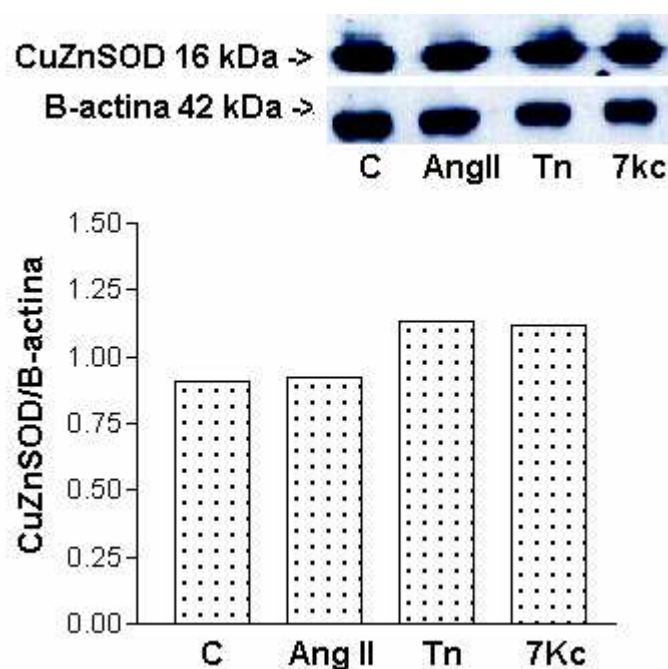


Figura 5: Análise de *western blotting* para expressão da CuZnSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 8 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 μ g/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 μ g/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

Para as amostras de células RASM incubadas por 18 horas, não foram observadas alterações na expressão da CuZnSOD nos 3 grupos estudados quando comparados ao controle (Figura 6). Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 101,1% para Ang II, 93,4% para Tn e 112,1% para 7kc.

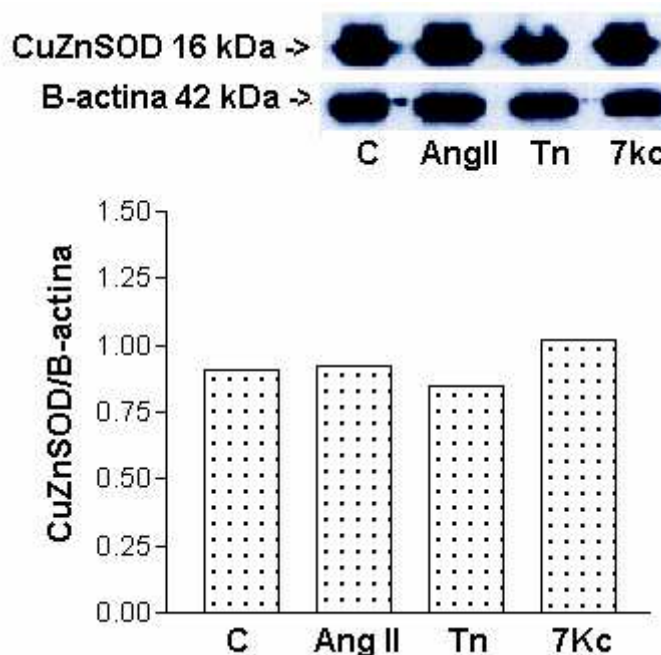


Figura 6: Análise de *western blotting* para expressão da CuZnSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 μ g/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 μ g/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

A Figura 7 mostra a expressão da MnSOD para as células RASM com estímulos de 4 horas, corrigidas pela expressão da β -actina para as mesmas amostras. Um aumento da expressão foi observado nas células estimuladas com tunicamicina. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 95,7% para Ang II, 136,0% para Tn e 108,6% para 7kc.

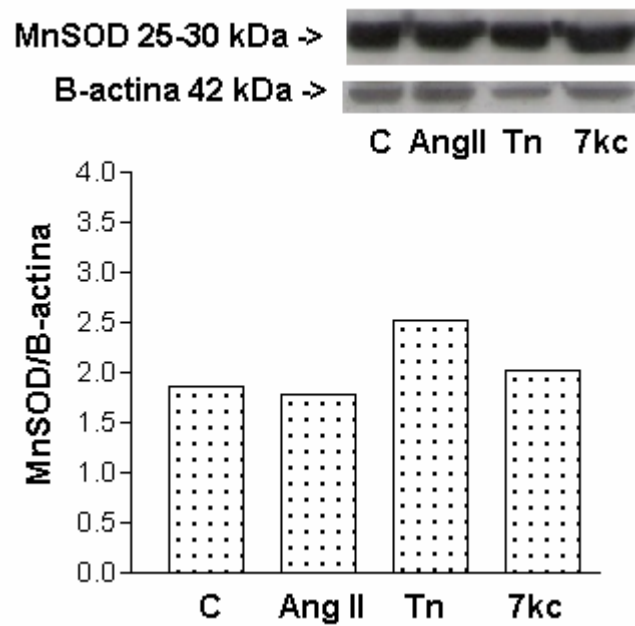


Figura 7: Análise de *western blotting* para expressão da MnSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 4 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 μ g/mL e 7-cetocolésterol (7kc) 5 μ g/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

A expressão da MnSOD para as amostras de células incubadas por 8 horas, com os diferentes estímulos, não mostrou alteração quando comparada com sua expressão na amostra controle (Figura 8). Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 102,0% para Ang II, 86,9% para Tn e 106,6% para 7kc.

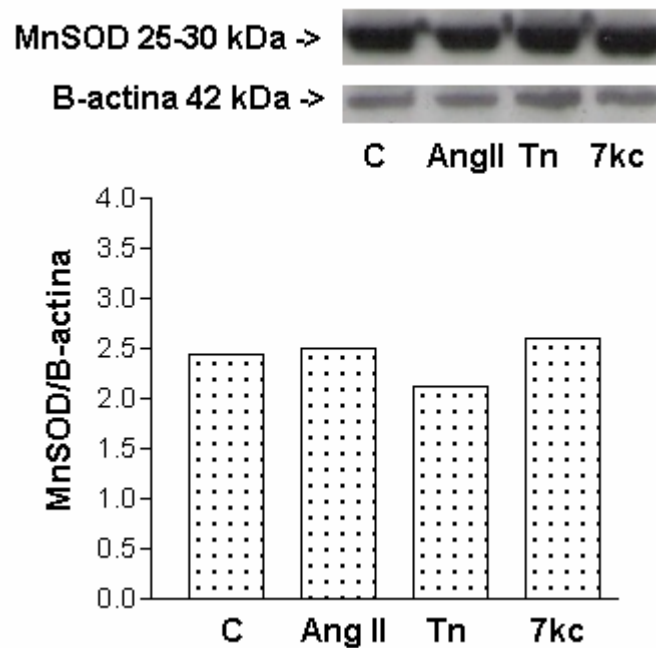


Figura 8: Análise de *western blotting* para expressão da MnSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 8 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 μ g/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 μ g/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

Para as amostras de células RASM incubadas por 18 horas com os estímulos, foi observada uma diminuição da expressão da MnSOD nos 3 grupos estudados (Figura 9). Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 55,9% para Ang II, 47,5% para Tn e 60,9% para 7kc.

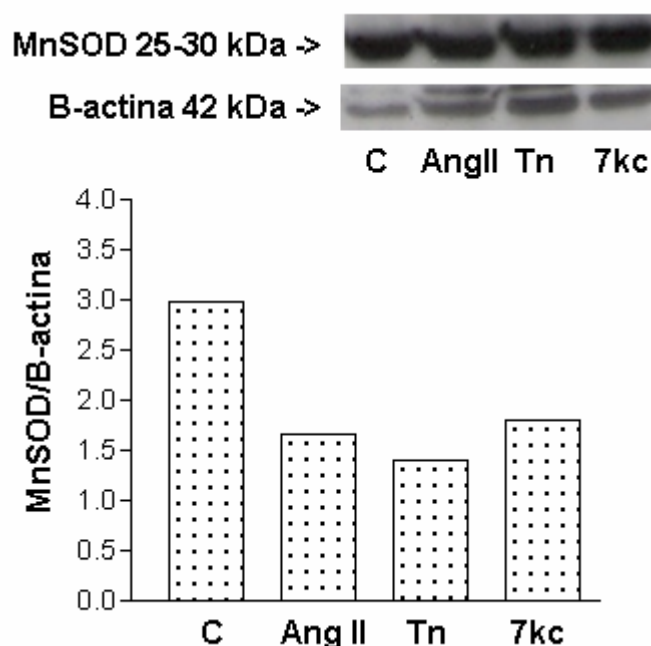


Figura 9: Análise de *western blotting* para expressão da MnSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 μ g/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 μ g/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

A Figura 10 mostra a expressão da EcSOD nas amostras de células RASM incubadas por 4 horas com os diferentes estímulos. Um aumento na expressão da proteína foi observado nas amostras estimuladas com tunicamicina e 7-cetocolesterol, em comparação ao controle. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 90,6% para Ang II, 126,4% para Tn e 115,1% para 7kc.

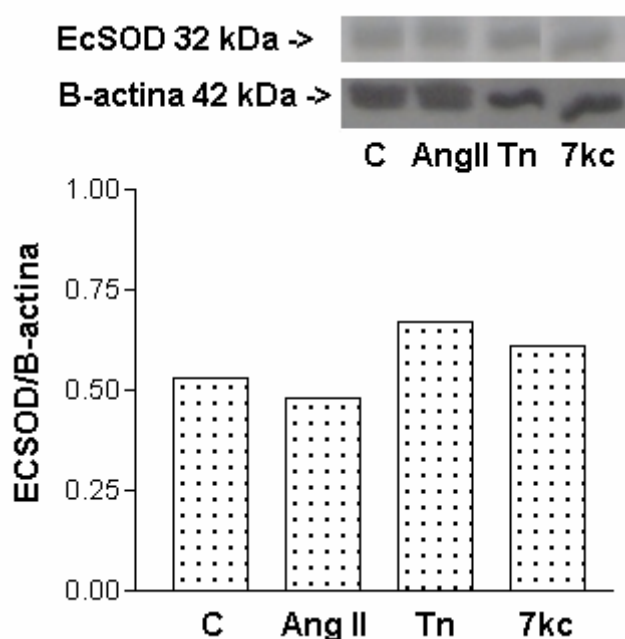


Figura 10: Análise de *western blotting* para expressão da EcSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 4 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 μ g/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 μ g/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

Para as amostras incubadas por 8 horas, observamos uma diminuição da expressão da EcSOD em todos os grupos, quando comparados com a expressão da proteína na amostra controle. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 54,5% para Ang II, 77,3% para Tn e 66,7% para 7kc (Figura 11).

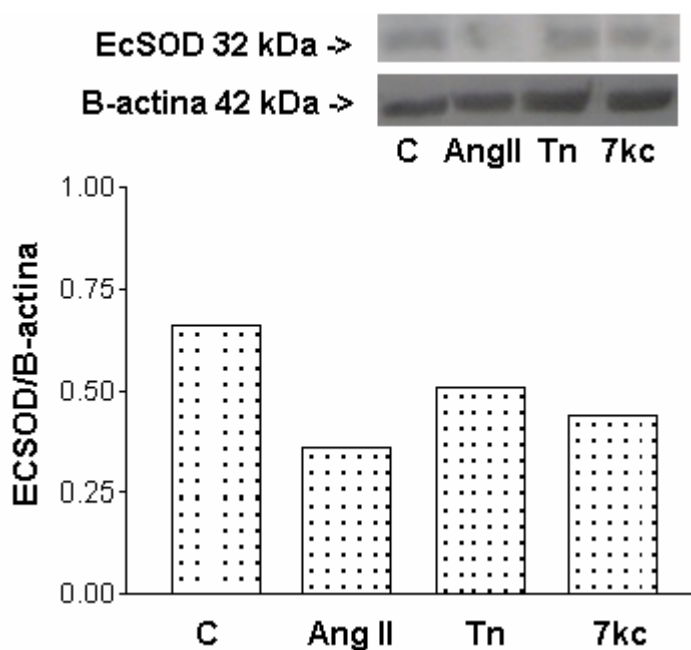


Figura 11: Análise de *western blotting* para expressão da EcSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em

homogenatos de células RASM incubadas por 8 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

A expressão da EcSOD nas amostras incubadas por 18 horas mostrou diminuição de expressão apenas para a amostra incubada com tunicamicina. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 109,2% para Ang II, 83,1% para Tn e 103,1% para 7kc (Figura 12).

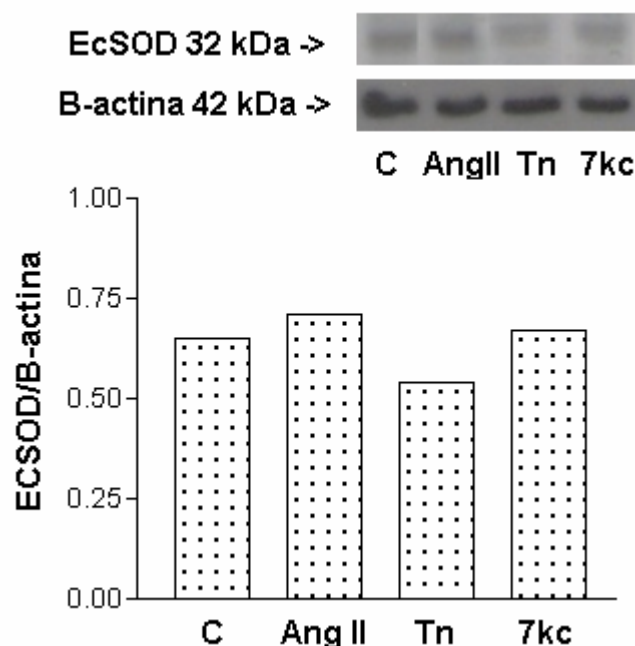


Figura 12: Análise de *western blotting* para expressão da EcSOD, corrigidos pela expressão da β -actina, em homogenatos de células RASM incubadas por 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras.

A Figura 13 representa a expressão da PrP^C nas amostras de células RASM incubadas por 4 horas com os agentes estressores do RE. O grupo referente à angiotensina II apresentou a maior diminuição na expressão da PrP^C comparada ao grupo controle. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 67,7% para Ang II, 79,1% para Tn e 79,1% para 7kc.

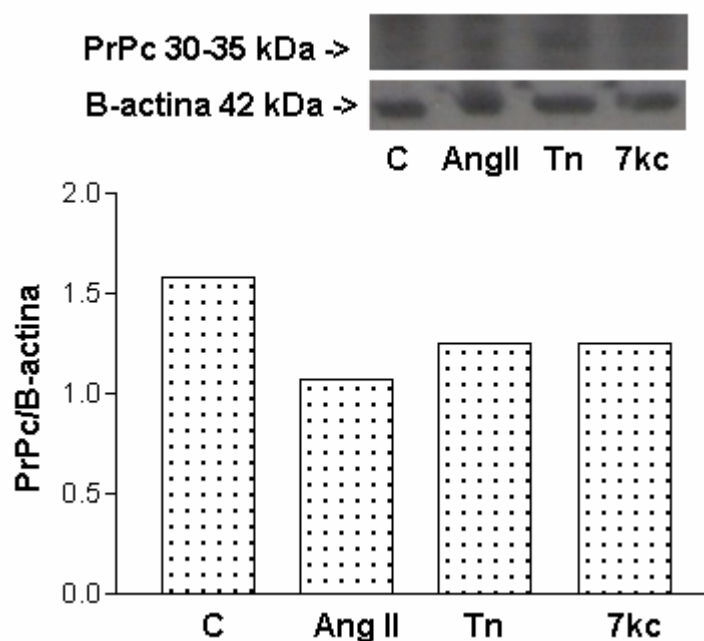


Figura 13: Expressão da PrP^C nas amostras de células RASM incubadas por 4 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras, corrigidos pela expressão da β-actina.

Para as amostras que foram incubadas por 8 horas, observamos uma diminuição da expressão da PrP^C em todos os grupos, sendo que houve uma diminuição mais pronunciada nas células expostas ao 7-cetocolesterol. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 82,6% para Ang II, 74,8% para Tn e 45,2% para 7kc (Figura 14).

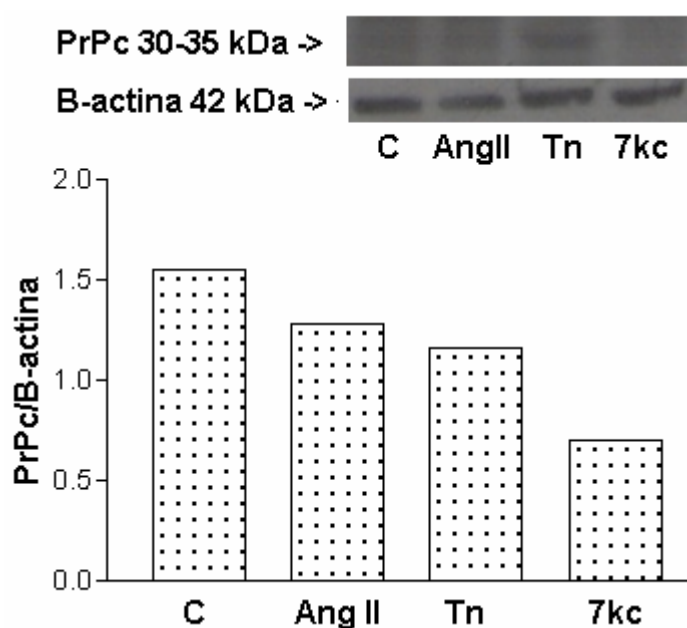


Figura 14: Expressão da PrP^C nas amostras de células RASM incubadas por 8 horas com angiotensina II (Ang II)

100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras, corrigidos pela expressão da β -actina.

A expressão da PrP^C, nas amostras submetidas a 18 horas de incubação, apresentou diminuição apenas para as células que foram tratadas com tunicamicina e 7-cetocolesterol. Os percentuais de expressão da proteína em relação ao controle foram: 101,2% para Ang II, 73,5% para Tn e 75,9% para 7kc (Figura 15).

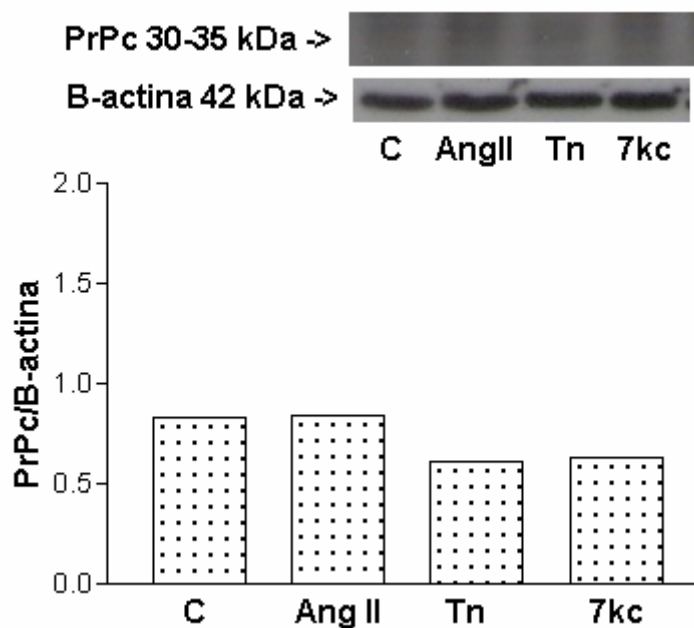


Figura 15: Expressão da PrP^C nas amostras de células RASM incubadas por 18 horas com angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL. Resultados representam a média (*pool*) de 3 amostras, corrigidos pela expressão da β -actina.

4.4 RT – PCR para PrP^C em células RASM

A expressão do mRNA para PrP^C nas amostras de células RASM incubadas por 4 horas mostrou diminuição para todos os estímulos analisados, com destaque para as células incubadas com angiotensina II, em que podemos observar uma diminuição de 50% na expressão do mRNA para PrP^C. Os percentuais de expressão do mRNA para a proteína em relação ao controle foram: 50,0% para Ang II, 90,0% para Tn e 60,0% para 7kc (Figura 16).

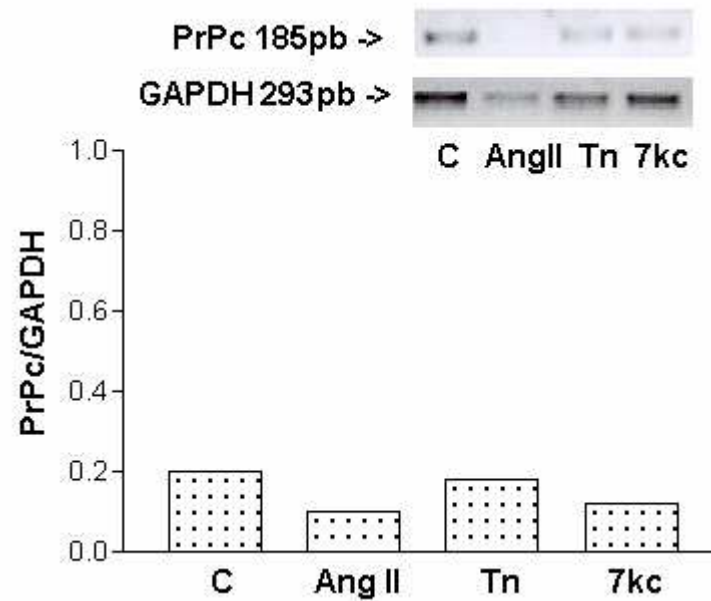


Figura 16: Expressão do mRNA para PrP^C, em amostra isolada de células RASM, expostas por 4 horas aos estímulos angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL, corrigidos pela expressão do gene GAPDH.

A RT-PCR para as células incubadas por 8 horas mostrou um aumento na expressão do mRNA para PrP^C com os 3 estímulos utilizados. A amostra exposta a angiotensina II mostrou o maior aumento. Os percentuais de expressão do mRNA para a proteína em relação ao controle foram: 128,2% para Ang II, 114,1% para Tn e 115,5% para 7kc (Figura 17).

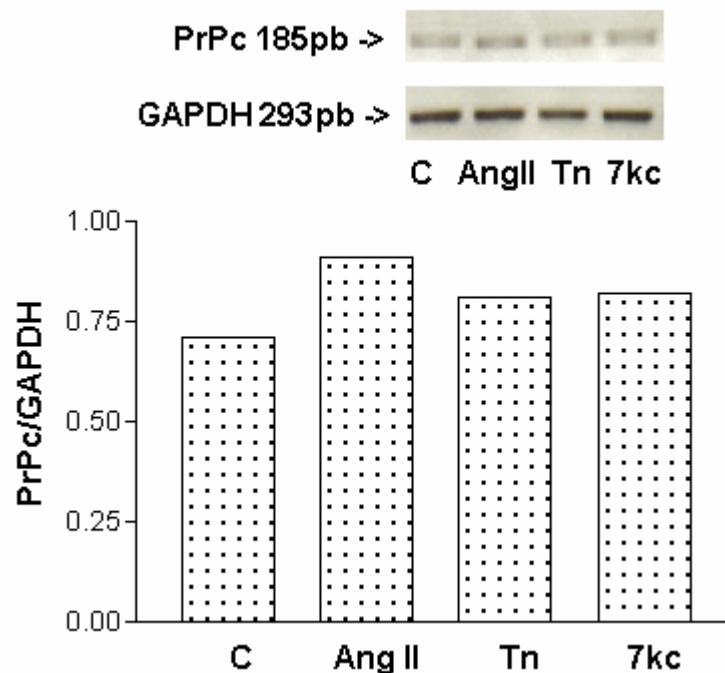


Figura 17: Expressão do mRNA para PrP^C, em amostra isolada de células RASM, expostas por 8 horas aos estímulos angiotensina II (Ang II) 100 nM, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL, corrigidos pela expressão do gene GAPDH.

Nas células após incubação por 18 horas, observamos uma diminuição de expressão do mRNA para PrP^C frente aos 3 estímulos. As células incubadas com tunicamicina e 7-cetocolesterol apresentaram maior diminuição quando comparadas ao controle. Os percentuais de expressão do mRNA para a proteína em relação ao controle foram: 45,2% para Ang II, 22,6% para Tn e 22,6% para 7kc (Figura 18).

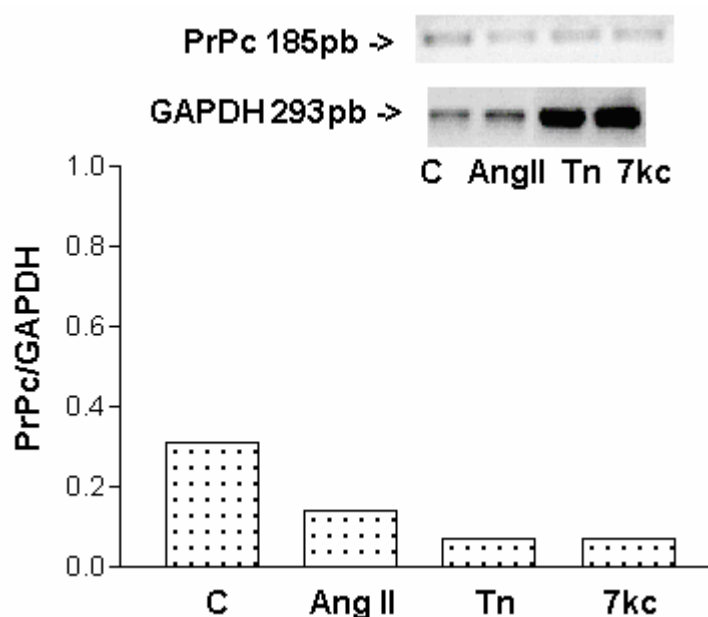


Figura 18: Expressão do mRNA para PrP^C, em amostra isolada de células RASM, expostas por 18 horas aos estímulos angiotensina II (Ang II) 100 nm/mL, tunicamicina (Tn) 5 µg/mL e 7-cetocolesterol (7kc) 5 µg/mL, corrigidos pela expressão do gene GAPDH.

4.5 RT-PCR para PrP^C, das artérias angioplastadas de coelhos

A Figura 19 representa o resultado obtido para a expressão do mRNA para PrP^C nas artérias dos animais submetidos à angioplastia, comparados com as artérias controle (C).

A expressão do mRNA para PrP^C nas amostras de artérias lesadas de “tempo zero” (L₀) foi de, aproximadamente, 3,6 vezes a expressão da proteína nas artérias controle (sem lesão). Para as amostras das artérias L₀ a expressão do mRNA para PrP^C aumentou cerca de 3,3 vezes, comparado com a expressão nas artérias contra-laterais (CL₀). Este aumento manteve-se após a repetição do mesmo

procedimento utilizado para obtenção das amostras de artérias lesadas no primeiro ensaio.

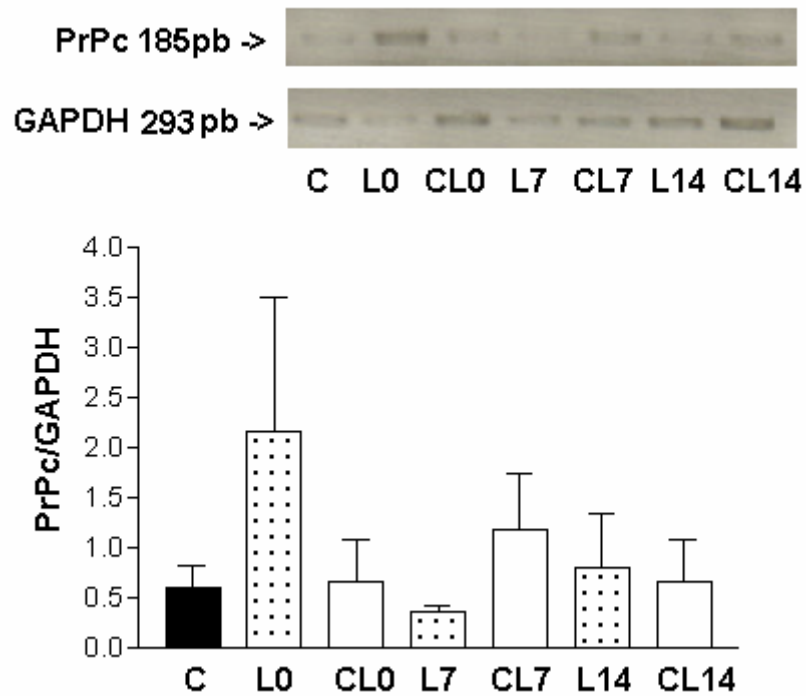


Figura 19: Expressão do mRNA para PrP^C nas artérias ilíacas lesadas (L) e contra-laterais (CL) de coelhos com sobrevida de zero, 7 e 14 dias após a angioplastia da artéria ilíaca direita, comparadas com a expressão do mRNA nas amostras de artérias controle (C). A expressão do mRNA para PrP^C foi corrigida pela expressão do gene para GAPDH nas mesmas amostras (n=2).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os agentes estressores angiotensina II, tunicamicina e 7-cetocolesterol produziram estresse do RE, o que pôde ser verificado com o perfil da atividade da SOD observado na Figura 2. O ensaio para a determinação da atividade da SOD mostrou um aumento significativo (~ 0,41 vezes) da atividade enzimática apenas nas amostras estimuladas com angiotensina II por 8 horas, em comparação com a atividade da enzima nas amostras controle (não estimuladas). Considerando que a Nox1 está presente na membrana plasmática e no RE e que a Nox4 foi encontrada apenas no RE (LASSÈGUE et al., 2001), este aumento pode ser devido à produção de EROs através da Nox4, como observado por O'Brien e col. (2006) em células epiteliais de córnea de coelhos. Além disso, recentemente, Zwirska-Korczala e col. (2007), utilizando cultura de células 3T3-L1 (pré-adipócitos), mostraram que a incubação com angiotensina II ($2,5 \times 10^{-9}$ M, $5,0 \times 10^{-6}$ M) também resultou em aumento na atividade da SOD.

Nossos resultados são concordantes com os dados apresentados por Griendling e col. em 1994, em que, após um período de 4 a 6 horas de incubação de VSMCs com angiotensina II (100 nmol/L) houve um aumento aproximado de 2,7 vezes na produção de superóxido comparado às células controle, o qual foi acompanhado por um aumento da atividade de ambas NADH e NADPH oxidases. O aumento da atividade da NADH e NADPH oxidases foi dose-dependente entre 0,01 e 1000 nmol/L.

Em 2001, Wingler e col., mostraram *in vitro* e *in vivo*, que após a exposição a angiotensina II 1 μ M por 4 horas, as expressões do mRNA para Nox1 e Nox4 foram aumentadas em 6 e 4 vezes, respectivamente. Didion e col. (2005) mostraram que a incubação de aortas de camundongos com 10 nmol/L de angiotensina II aumentou os níveis de superóxido em relação às aortas tratadas apenas com água deionizada. Conforme os dados apresentados pelos autores citados acima, podemos admitir a atividade estressora da angiotensina II pela produção de superóxido e justificar seu uso como agente indutor de estresse do RE em nosso modelo experimental.

Ainda com relação à angiotensina II, nos tempos de incubação de 4 e 18 horas, a atividade da SOD foi menor ou semelhante ao controle. Estes dados são concordantes com os obtidos em experimento prévio realizado no laboratório de

Biologia Vascular do InCor/FMUSP (ALVES LP, resumo SBBq 2006), onde células RASM foram estimuladas com angiotensina II (100 nM) por 30 minutos, 1, 2, 4 e 14 horas.

Os demais estímulos (tunicamicina e 7-cetocolesterol) produziram uma diminuição da atividade da SOD, quando comparada ao grupo controle durante os 3 tempos de incubação (4, 8 e 18 horas). As diferentes concentrações utilizadas por outros autores mostram que estes agentes causam desde o estresse do RE até a apoptose celular, dependendo da dose e do tempo de exposição ao agente estressor.

Embora não tenhamos referenciado nenhum trabalho onde tenha sido utilizado o mesmo tipo celular empregado como modelo experimental (células RASM) em nosso estudo, podemos sugerir que o tipo celular pode influenciar na resposta aos estímulos, como relataremos a seguir, devido à diferença de comportamento celular frente a cada agente estressor. Outra questão implicada na discussão do estresse provocado no ambiente celular é quanto à concentração dos agentes estressores utilizada e os períodos de incubação das células em cultura.

Recentemente, Ohtsuka, Miyashita e Shirai, utilizando o modelo de SMCs obtidas de artérias coronárias humanas, demonstraram que o 7-cetocolesterol extraído de lesões ateroscleróticas humanas (*post mortem*) poderia estar em concentrações suficientemente altas para induzir a apoptose das SMCs, e que o acúmulo deste oxiesteroide nas lesões poderia diminuir o número de células no local e tornar a placa aterosclerótica vulnerável (OHTSUKA; MIYASHITA; SHIRAI, 2006). Em 2004, Martinet e col., trabalhando com cultura de VSMCs humanas, já haviam mostrado que a morte celular era induzida pelo 7-cetocolesterol utilizando uma concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ (= 40,8 $\mu\text{g/mL}$) com incubação de 24 horas.

A produção de superóxido mediada pelo 7-cetocolesterol foi relatada por Pedruzzi e col. (2004), em estudo dose e tempo-dependente, em que a exposição ao 7-cetocolesterol aumentou aproximadamente 3 vezes a expressão do mRNA para Nox4 em SMCs. Por meio de análises de *western blotting*, após a incubação das SMCs humanas com 7-cetocolesterol 100 μM por 8 e 16 horas, os autores também observaram aumento nos níveis da proteína Nox4.

Em contraste com os dados apresentados por Pedruzzi e col., um estudo de O'Callaghan, Woods e O'Brien (2001), utilizando células U937 (linhagem de células monocíticas humanas), mostrou que a atividade da SOD não se alterava após

incubação com 7-cetocolesterol ($30 \mu\text{mol/L} = 12,2 \mu\text{g/mL}$) durante 12 horas. Então, podemos inferir que, havendo uma produção aumentada de superóxido quando as células são expostas ao 7-cetocolesterol, poderíamos esperar que houvesse, também, um aumento da atividade da SOD nestas células como resposta ao estresse provocado. Mas, como as células de nosso modelo experimental não mostraram este perfil de resposta ao estresse, podemos sugerir que a concentração aplicada e os tempos de exposição ao estímulo não tenham sido suficientes para induzir tal resposta em nosso modelo.

Com relação ao comportamento celular frente à exposição à tunicamicina, podemos apontar observações semelhantes às aquelas com os estímulos anteriormente citados. Devido à carência de trabalhos com células RASM frente aos estímulos utilizados, somos induzidos a lançar hipóteses quanto às respostas obtidas, traçando comparações com diferentes tipos celulares.

Uma vez que existem trabalhos relatando a capacidade estressora do RE exercida pela tunicamicina, em diferentes concentrações e tempos de exposição celular, está claro que a escolha do agente estressor para nosso estudo foi bem fundamentada. Recentemente, Suzuki e col. (2006), utilizando como modelo experimental células de neuroblastoma humano (células IMR-32), mostraram que após 3 e 6 horas de incubação com tunicamicina ($0,3 \mu\text{M} = 0,25 \mu\text{g/mL}$), ocorria um aumento na produção de EROs. E ainda constataram que a tunicamicina possuía um efeito inibitório do crescimento celular dependente do tempo de exposição, sendo que, após 48 horas o efeito inibitório observado era maior do que em 24 horas.

Trabalhando com concentrações semelhantes à utilizada no presente estudo, Shimazawa e col. (2007) mostraram que a tunicamicina (1 a $4 \mu\text{g/mL}$) induzia o estresse do RE associado as proteínas BiP (*Immunoglobulin Binding Protein*), p-eIF2 α (*phosphorylation α subunit translation initiation factor 2*) e CHOP (*C/EBP homologous protein*) em cultura de células RGC-5 (*retinal ganglion cell-5*) de ratos, e observaram que os níveis destas proteínas começavam a aumentar de 2 a 6 horas após o início do tratamento com tunicamicina. Estas proteínas estão relacionadas à remoção de proteínas modificadas pela ligação à ubiquitina. Neste contexto, a PrP^C pode fazer parte das proteínas ligadas ao sistema ubiquitina-proteassoma, que

seriam removidas da célula submetida ao estresse. Uma vez que a expressão da PrP^C mostrou-se diminuída nos três tempos de incubação com a tunicamicina.

Quanto ao provável envolvimento da PrP^C com a atividade antioxidante das enzimas SOD, alguns trabalhos (BROWN et al., 1997a,b; BROWN; NICHOLAS; CANEVARI, 2002; BROWN; BESINGER 1998; HERMS et al. 1999) relataram que os cérebros de camundongos *Prn-p^{0/0}* possuem um conteúdo reduzido de Cu²⁺ e diminuição das atividades enzimáticas de várias enzimas dependentes de Cu²⁺, como a CuZnSOD. Outros estudos (BROWN et al. 1997a, 1998; BROWN; CERVENAKOVA; DIRINGER, 2001; BROWN; NICHOLAS; CANEVARI, 2002; WHITE et al., 1999; WONG et al., 2001a,b) sugeriram que a ausência de PrP^C resulta em um aumento da sensibilidade dos neurônios a vários tipos de injúrias oxidativas, uma condição que pode depender da ligação de íons Cu²⁺ à PrP^C.

A concentração de cobre presente nos homogenatos celulares analisados no IPEN/IQUSP (Figura 3) aumentou aproximadamente 9 vezes para as amostras estimuladas com angiotensina II durante 8 horas, quando comparadas ao controle, sendo condizente com o aumento da atividade da SOD nas mesmas condições. No entanto, a expressão da isoenzima CuZnSOD permaneceu inalterada no mesmo período e apenas a expressão da EcSOD se alterou, com uma diminuição de aproximadamente 45% em relação ao controle.

Embora o aumento da concentração de cobre concorde com o aumento da atividade da SOD, a expressão da PrP^C não acompanhou o mesmo perfil. Podemos também observar que a expressão do mRNA para a PrP^C aumentou (~ 28%) nas mesmas condições, questionando, assim, a relação da PrP^C com a atividade antioxidante de enzimas dependentes de íons Cu²⁺. Este aumento do mRNA poderia estar associado com a maior disponibilidade de Cu²⁺ para incorporação à PrP^C, cuja expressão voltou a ser semelhante àquela observada nas células controle após 18 horas de exposição à angiotensina II.

Muitos trabalhos a respeito da PrP relacionam sua presença com a atividade e expressão da enzima CuZnSOD. Como observado por Brown e Besinger (1998), que investigaram se a superexpressão de PrP^C em camundongos também alterava a atividade da CuZnSOD, encontraram que a atividade da SOD-1 variava de acordo com a intensidade da expressão da PrP^C. Os resultados do estudo sugeriram que a PrP^C regulava a incorporação de Cu²⁺ à CuZnSOD, e que a habilidade da PrP^C em ligar Cu²⁺ poderia modular a atividade da enzima e, conseqüentemente, a resistência

celular ao estresse oxidativo. Em nossos resultados não podemos observar alteração da expressão da CuZnSOD, eventualmente, devido à baixa expressão da PrP^C presente em nossas amostras, independente dos tempos de exposição aos diferentes estímulos que desencadeiam o estresse do RE.

Brown e Besinger ainda relataram que, além da PrP^C ligar íons Cu²⁺, ela agiria como um sensor da sua presença no ambiente e a emissão de sinais intracelulares poderia ativar outros mecanismos para a sua captação (BROWN; BESINGER, 1998). Como citamos anteriormente, o aumento da expressão do mRNA para PrP^C pode estar associado ao aumento da disponibilidade de íons Cu²⁺ nas amostras estimuladas com angiotensina II por 8 horas, assim concordando com a hipótese de Brown e Besinger para uma função da PrP^C como um sensor para íons Cu²⁺. Embora a expressão do mRNA para PrP^C também esteja aumentada na presença de tunicamicina e 7-cetocolesterol em 8 horas de exposição, este aumento é menos intenso quando comparado com a exposição à angiotensina II, e também a concentração de Cu²⁺ nestas amostras não se alterou em relação às amostras controle nas mesmas condições.

Em 2000, Wong e col., comparando a atividade da SOD em extratos de diferentes regiões do cérebro de camundongos normais, antes e depois da depleção da PrP^C, encontraram que a retirada da PrP^C dos lisados de cérebro reduzia a atividade da SOD. Os dados apresentados implicam na habilidade da PrP^C em contribuir para a atividade da SOD *in vivo*, apesar de sua menor afinidade pelo Cu²⁺ em comparação a outras enzimas ligadoras deste íon. Posteriormente, Wong e col. (2001) demonstraram uma acentuada diminuição da atividade SOD-like pela PrP imunopurificada em cérebros infectados com o prion. Esta perda de função pela PrP foi associada com uma significativa perturbação nas concentrações de metal no cérebro, especialmente o cobre, acompanhada por uma significativa redução na atividade da CuZnSOD.

Em 1997(b), Brown e col., em um estudo com camundongos *Prn-p^{0/0}*, mostraram um aumento da atividade da enzima MnSOD nestes animais, sugerindo um mecanismo compensatório pela perda de atividade da CuZnSOD devido à ausência da PrP^C. Os autores ainda observaram que as células cerebelares *Prn-p^{0/0}* eram mais susceptíveis ao estresse oxidativo e que a PrP^C poderia, direta ou indiretamente, regular a atividade da CuZnSOD.

No presente estudo podemos observar um aumento da expressão da MnSOD, mas não da atividade da SOD, nas células estimuladas com tunicamicina por 4 horas, juntamente com uma diminuição da expressão da PrP^C para este mesmo grupo de células. Os dados mostrados por Brown e col. (1997b) podem ser comparados aos nossos resultados no que se refere à expressão da proteína MnSOD, que se manteve próxima da expressão observada nas amostras controle de 4 e 8 horas de estímulo, enquanto a expressão da PrP^C estava diminuída nas mesmas amostras.

Para a MnSOD, a expressão da proteína aumentou (~ 36%) em comparação ao controle, apenas no grupo que foi estimulado com tunicamicina por 4 horas. Quando incubadas por 8 horas, com os diferentes estímulos, a expressão da isoenzima diminuiu em relação ao controle apenas na amostra estimulada com tunicamicina, enquanto a angiotensina II e o 7-cetocolesterol não alteraram a expressão da MnSOD no mesmo período. Já na incubação das células por 18 horas foi observado uma diminuição da expressão da proteína com os três estímulos.

Em 2003, Guo e col. utilizando rins de ratos como modelo experimental, mostraram que a expressão da proteína MnSOD não era significativamente diferente entre o grupo com infusão de angiotensina II e o grupo sem tratamento. A atividade da SOD nos rins também foi inalterada entre os dois grupos, contudo, a atividade da MnSOD diminuiu significativamente (~ 50%) no grupo com infusão de angiotensina II comparado ao grupo não tratado. Em nosso modelo, os resultados quanto a exposição à angiotensina II foram concordantes com Guo e col. no que diz respeito à expressão da MnSOD, com exceção das amostras estimuladas por 18 horas, em que observamos uma diminuição da expressão da proteína.

Nossos resultados para MnSOD referentes à exposição à tunicamicina durante 4 horas, concordam com os dados apresentados por Kaneko e col. (2004), em um estudo utilizando culturas de células HeLa. Os autores mostraram que a expressão da proteína e do mRNA para MnSOD aumentou durante o tratamento com agentes indutores do estresse do RE, entre eles, a tunicamicina (2 µg/mL, por 12 horas). Uma vez que utilizamos 5 µg/mL de tunicamicina, isto pode justificar a diminuição do tempo de resposta (4 horas) da expressão da proteína em nosso modelo com as células RASM.

A expressão da EcSOD nas células RASM foi um pouco diferente da MnSOD frente aos três estímulos e tempos de incubação. Como para a MnSOD, a EcSOD

aumentou sua expressão nas células incubadas por 4 horas com tunicamicina (Figura 10), mas um aumento também foi observado frente à estimulação com 7-cetocolésterol durante o mesmo período. Para as células incubadas por 8 horas (Figura 11), podemos observar que a expressão da EcSOD diminuiu nos três grupos estimulados com os agentes estressores do RE, com maior diminuição para as amostras estimuladas com angiotensina II. E diferentemente das amostras avaliadas quanto à expressão da MnSOD, que apresentaram uma diminuição pronunciada quando expostas aos três estímulos por 18 horas, a expressão da EcSOD apenas diminuiu (16,9%) nas células estimuladas com tunicamicina (Figura 12).

Welch e col., em 2005, mostraram *in vivo* que a infusão de angiotensina II (200 ng/kg/min) em ratos aumentava a atividade da NADPH oxidase, acompanhada pelo aumento da expressão da p22^{phox} e diminuição da expressão do mRNA para EcSOD. Esta diminuição do mRNA observada pelos autores acima citados pode ser relacionada, ainda que em experimento *in vivo*, com nossos resultados, em que a expressão protéica da EcSOD diminuiu após a incubação com angiotensina II por 8 horas.

Em 1999, Fukai e col. mostraram *in vivo* que após o sétimo dia de infusão de angiotensina II, havia uma supra-regulação da expressão da proteína EcSOD em um modelo dose-dependente, e em contraste, observaram que a expressão da CuZnSOD não se alterava. Constataram ainda que a infusão de angiotensina II aumentava a expressão do mRNA para EcSOD em um modelo tempo e dose-dependente. E que a atividade da SOD foi similar em aortas de camundongos controle e hipertensos, contudo, quando ensaios específicos foram feitos para cada isoenzima da SOD, observaram que a atividade da EcSOD aumentava significativamente em aortas de camundongos com hipertensão induzida pela angiotensina II. Os autores mostraram, *in vitro*, que a angiotensina II (100 nmol/L) também aumentava a expressão da proteína EcSOD em culturas organóides de aortas de camundongo (*mouse aortas in organoid cultured*) e que a expressão do mRNA para EcSOD em culturas de células musculares lisas de aortas humanas (HASM) também aumentava após 12 horas de exposição à angiotensina II.

Nossos resultados quanto à expressão da EcSOD, após 18 horas de incubação com angiotensina II, são concordantes com esta última colocação a respeito das células HASM feita por Fukai e col. Após uma diminuição da expressão da proteína em 8 horas de exposição ao agente estressor do RE, podemos observar

seu retorno ao nível da expressão de EcSOD na amostra controle após 18 horas de contato com o estímulo, o que pode ser devido ao aumento da expressão do mRNA para esta proteína.

Em estudo prévio do Laboratório de Biologia Vascular do InCor/FMUSP (ALVES LP, resumo SBBq 2006), utilizando células RASM, foi realizado um acompanhamento do perfil de atividade da SOD após a exposição à angiotensina II (100 nM) por 30 minutos, 1, 2, 4 e 14 horas. Durante estes períodos de incubação das células, não foram observadas alterações significativas quanto à atividade da SOD. Também foram realizadas análises de *western blotting* com as amostras de 14 horas de incubação e igualmente não foram observadas alterações na expressão da proteína CuZnSOD.

Pelo fato de termos observado aumento da atividade da SOD nas amostras de células incubadas com angiotensina II por 8 horas, analisamos a expressão da CuZnSOD por *western blotting* durante o mesmo período de incubação com os três agentes estressores do RE, na tentativa de relacionarmos os resultados obtidos com a atividade da enzima e as concentrações de cobre. Observamos que a proteína CuZnSOD manteve o mesmo perfil de expressão apresentado no estudo anteriormente realizado no laboratório, para as amostras de 4 e 18 horas. Já para a amostra de 8 horas observamos que, frente à angiotensina II, a enzima não mostrou alteração de expressão quando comparada ao controle. Enquanto que as células expostas a tunicamicina e 7-cetocolesterol mostraram um pequeno aumento de expressão da proteína.

Frente a estes resultados não foi possível relacionar o aumento de atividade da SOD e a concentração de Cu^{2+} nas amostras estimuladas com a angiotensina II por 8 horas, com o perfil de expressão da isoenzima CuZnSOD. O estresse provocado pela exposição à angiotensina II, pode ter induzido um aumento na atividade da SOD sem que fosse necessário um aumento da expressão de suas isoenzimas. Já a concentração de Cu^{2+} aumentada pode estar relacionada com o aumento da expressão do mRNA para a PrP^{C} , como mencionado anteriormente.

A diminuição na expressão da PrP^{C} , em 4 e 8 horas de exposição aos estímulos, pode ser devido a uma destruição da proteína em resposta inicial ao estresse. Mas uma mudança neste quadro foi observada com as células expostas à angiotensina II, que após 18 horas de incubação, apresentaram uma expressão da PrP^{C} similar àquela observada nas amostras controle em condições iguais. Com os

outros dois estímulos (tunicamicina e 7-cetocolesterol) também observamos diminuição da expressão da proteína, mas com certa atenuação com o passar do tempo de incubação, ou seja, ao final das 18 horas de exposição aos agentes estressores do RE, a porcentagem de expressão da PrP^C não estava tão diminuída quanto nas primeiras 4 horas de incubação. Possivelmente, o estresse do RE provocado pela exposição à angiotensina II favoreceu a resposta das células RASM à produção de PrP^C em relação aos outros estímulos.

A expressão do mRNA para a PrP^C foi avaliada através de RT-PCR, a partir do RNA extraído das células RASM em cultura. As amostras incubadas por 8 horas com os três agentes estressores do RE apresentaram um aumento da expressão do mRNA para a PrP^C, em comparação ao controle. As células estimuladas com angiotensina II apresentaram maior expressão que àquelas incubadas com os outros dois estímulos. Já para os tempos de incubação de 4 e 18 horas observamos uma diminuição bastante pronunciada da expressão do mRNA para a PrP^C, principalmente, nas amostras incubadas com angiotensina II e 7-cetocolesterol durante 4 horas, e tunicamicina e 7-cetocolesterol por 18 horas.

O aumento da expressão do mRNA para a PrP^C após 8 horas de incubação com os estímulos pode ser devido a uma resposta celular ao estresse provocado, na tentativa de uma maior produção da proteína para que esta sirva de captadora de Cu²⁺ para as enzimas antioxidantes na resposta ao estresse provocado. Isto se pensando na hipótese de que a PrP^C seja uma proteína armazenadora de Cu²⁺. Ou, tendo em vista a suposta função protetora da proteína, este aumento de transcrição do mRNA também poderia traduzir uma resposta celular de defesa do tecido lesado contra espécies reativas, devido ao estresse provocado pelos estímulos.

O aumento da expressão do mRNA, também pode justificar a normalização da expressão da proteína, observada por análises de *western blotting*, após incubação com angiotensina II por 18 horas, ou seja, o aumento da transcrição do mRNA para PrP^C em 8 horas de exposição, resultou na maior produção da PrP^C observada após as 18 horas de incubação.

A observação prévia, por imuno-histoquímica, de diferentes quantidades de PrP^C em artérias lesadas e normais de coelhos submetidos à angioplastia por cateter balão, motivou a pesquisa da expressão do mRNA para a PrP^C nas mesmas condições. Considerando que existe um aumento do estresse oxidativo (via produção de O₂^{*}) após a lesão causada pela angioplastia, como relatado por Souza

e col. (2000) em estudo com coelhos, em que a injúria arterial por cateter balão causou imediato e acentuado aumento de $O_2^{\bullet-}$.

Em nosso estudo, a expressão do mRNA para a PrP^C não mostrou alterações consideráveis entre os animais com sobrevida de 7 e de 14 dias após a lesão. No entanto, um aumento pronunciado na expressão do mRNA para a PrP^C foi visto quando as artérias ilíacas dos animais foram analisadas logo após a lesão. Este resultado concorda com o aumento de $O_2^{\bullet-}$ relatado pelos autores acima citados e com a observação dos cortes histológicos das artérias do estudo prévio comentado acima.

Em 2003, Leite e col., utilizando um modelo de distensão de artérias ilíacas de coelhos, observaram que a atividade da SOD vascular diminuía 45% e 34% em 7 e 14 dias após a injúria, respectivamente. Os resultados das análises de *western blotting* para a CuZnSOD mostraram que, no sétimo dia após a lesão, a redução na expressão da enzima era maior que no 14º dia após a lesão. Contrastando com a diminuição da CuZnSOD, a expressão da EcSOD foi significativamente maior no dias 7 e 14 após a lesão, enquanto a expressão de MnSOD permaneceu inalterada no mesmo período. Com estes resultados, Leite e col. mostraram que a diminuição da atividade das isoenzimas da SOD não foi acompanhada pela mudança paralela em suas expressões.

Em nossos experimentos com os fragmentos das artérias ilíacas lesadas e contra-laterais de coelhos, vimos que a expressão do mRNA para PrP^C não alterou-se nos animais com sobrevida de 7 e 14 dias após a lesão. Comparando com os dados apresentados por Leite e col. (2003), em que a atividade da SOD diminuiu significativamente nos dias 7 e 14 após a lesão, podemos sugerir que a PrP^C não teve influência sobre a atividade antioxidante frente ao estresse oxidativo ao qual foram submetidas as artérias.

O aumento da expressão da proteína logo após a lesão, observado nos cortes histológicos por imuno-histoquímica, foi condizente com o aumento da expressão do mRNA para PrP^C observado nas artérias ilíacas logo após a angioplastia (grupo “tempo zero”) em nosso estudo. Este aumento da expressão do mRNA para PrP^C nas artérias lesadas logo após a lesão, poderia ser devido a uma atividade protetora da proteína assim como relatado para o tecido neuronal (ROUCOU; GAINS; LEBLANC, 2004). Isto explicaria o aumento inicial do mRNA como uma tentativa de proteção ao tecido lesado, sinalizando o estímulo para produção da proteína.

Uma vez confirmado o aumento do radical superóxido nas artérias após angioplastia (SOUZA et al., 2000), frente aos nossos resultados, essa expressão inalterada do mRNA, em 7 e 14 dias após a lesão, dificulta a associação da PrP^C a uma atividade antioxidante, pelo menos neste modelo de lesão. Visto que a expressão do mRNA para PrP^C nas artérias contra-laterais foi similar a expressão observada nas artérias controle (de animais não submetidos à angioplastia). Talvez uma análise após um período menor de tempo (por exemplo, 24 horas após a lesão) poderia evidenciar uma relação da PrP^C com a atividade antioxidante exercida pela SOD, entretanto este tempo não costuma ser estudado nos modelos experimentais com sobrevida após a lesão.

Nossos dados, quanto à expressão do mRNA para PrP^C, podem ser comparados com outro modelo de estresse, utilizado por Weise e col. (2004), que mostraram, nas primeiras horas após isquemia cerebral focal permanente, uma supra-regulação significativa da PrP^C no hemisfério cerebral isquêmico. Os autores relataram que a intensidade desta supra-regulação dependia da severidade da isquemia, refletindo assim, a extensão do dano neuronal. A regulação positiva para a PrP^C foi observada em 4 e 8 horas após a injúria, e este aumento não foi mais detectado após 24 horas. Nossos resultados, mostrando aumento da expressão do mRNA para PrP^C logo após a lesão, correlacionaram-se com os dados fornecidos por Weise e col., sendo que o mRNA retornou aos níveis observados nas artérias controle após 7 e 14 dias da lesão.

Para o melhor entendimento e até determinação de uma possível função, da PrP^C, em células vasculares, seriam necessários outros ensaios para verificar o comportamento da proteína frente ao estresse provocado durante os procedimentos testados no estudo, como a angioplastia. O ideal seria a realização de ensaios de *western blotting* para a expressão da PrP^C também nas artérias lesadas e normais dos coelhos submetidos à angioplastia, para verificar o comportamento da proteína durante o período de sobrevida, bem como no momento inicial logo após a lesão. Embora os cortes histológicos feitos anteriormente (dados não publicados) sirvam de base para a nossa discussão.

Muitas são as questões que envolvem a PrP^C tendo, ou não, uma atividade SOD-*like*. Alguns autores defendem esta função enquanto outros descartam a possibilidade de atuação da PrP^C no sistema antioxidante celular, como veremos a seguir.

Segundo Brown e col. (1997b), a PrP^C teria uma atividade como a da SOD e ainda uma possível função protetora contra o estresse oxidativo. Rachidi e col. (2003) verificaram que a expressão de PrP^C em células do epitélio renal de coelhos aumentava a ligação de Cu²⁺, mas não a sua incorporação, e que a resistência ao estresse oxidativo foi obtida pela maior atividade de várias enzimas antioxidantes. Assim, mostraram que a indução da expressão da PrP^C aumentava a atividade da SOD, da CuZnSOD e da glutathione redutase, e que a atividade da MnSOD permanecia inalterada. Os autores propuseram que o aumento da atividade da CuZnSOD nas células estimuladas seria devido à atividade SOD-*like* do complexo PrP- Cu²⁺ na parte externa da membrana celular, o que suportaria sua hipótese de ser a PrP^C um sensor extracelular para o Cu²⁺.

Em 2001, Klamt e col. sugeriram que a PrP^C participava da defesa antioxidante no organismo como um todo e não somente no cérebro. O estudo mostrou a diminuição da atividade das enzimas SOD e catalase em camundongos deficientes para PrP, juntamente com aumento da lipoperoxidação, oxidação de proteínas e modulação da atividade da ornitina descarboxilase, o que serviu de base para a hipótese antioxidante dos autores quanto à função fisiológica da PrP^C.

Recentemente, Treiber e col. (2007) utilizando um modelo com cultura de leveduras, mostraram que a atividade da SOD-1 em células expressando PrP e tratadas com Cu²⁺ não era devida ao aumento na SOD-1 endógena, mas a uma atividade SOD-*like* exercida pela PrP. Portanto, concluíram que as leveduras expressando PrP haviam adquirido uma atividade SOD-*like* como resultado da adição de Cu²⁺ ao meio de cultura.

No entanto, outros grupos mostram-se contrários à hipótese da atividade SOD-*like* da PrP^C. Um estudo de Waggoner e col. (2000) mostrou que a quantidade de Cu²⁺ nas frações subcelulares presentes no cérebro não eram significativamente diferentes entre camundongos expressando uma ou dez vezes os níveis de PrP, ou não expressando a proteína. Também não observaram nenhum efeito da expressão da PrP^C sobre a atividade enzimática e a concentração de Cu²⁺ da SOD-1, ou, sobre a atividade da citocromo c oxidase (outra enzima dependente de cobre no cérebro).

Em 2003, Hutter, Heppner e Aguzzi, cruzaram camundongos expressando níveis variados de PrP^C e SOD-1 (incluindo animais *knockout* para PrP e para SOD-1), e não encontraram alterações na atividade das enzimas SOD-1 ou SOD-2. Os autores concluíram que a PrP^C não contribuía visivelmente *in vivo* para a atividade

da SOD e que a proteína não possuía uma atividade dismutase intrínseca. Já em 2005, os ensaios realizados por Jones e col. determinaram que a PrP possuía menos de 0,1% da atividade de uma enzima SOD-1, o que os levou a concluir que a PrP não mostrava atividade antioxidante *in vitro*.

Recentemente, Legleiter e col. (2007) estudando o efeito da deficiência de Cu^{2+} em bovinos adultos e sua relação com a PrP, não detectaram nenhuma mudança na atividade da SOD em amostras de tecido cerebral. Isto indicaria que as diminuições nas concentrações de cobre no cérebro não teriam efeito algum sobre a atividade da SOD ou sobre a suposta atividade SOD-like da PrP^{C} .

Na verdade, uma discussão mais profunda a respeito das funções fisiológicas da proteína do prion tem sido conduzida há muito tempo por diversos autores, principalmente, no tecido neuronal, onde os autores tentam justificar uma possível atividade SOD-like para a PrP^{C} .

Podemos sugerir que o envolvimento da PrP^{C} com a atividade antioxidante proposta por outros autores deve ser célula e/ou resposta-específica ao tipo de estresse provocado, uma vez que não conseguimos observar um comportamento antioxidante da PrP^{C} nas células em estudo. A maioria dos experimentos realizados para comprovar a atividade antioxidante da PrP^{C} tem sido realizada com camundongos normais e *knockout* para PrP^{C} , em células e extratos de tecido cerebral, onde sabidamente a PrP^{C} é mais abundante.

Outra justificativa possível, para que a PrP^{C} atinja uma atividade SOD-like, seria a necessidade de elevada concentração de PrP^{C} presente nas células, o que não foi avaliado em nosso modelo, já que optamos por observar apenas o tipo de comportamento celular frente aos estímulos utilizados, e não uma resposta dependente da concentração de PrP^{C} .

Em nosso modelo, com os estímulos utilizados, ensaios para a atividade da SOD, concentração de cobre, expressão das isoenzimas da SOD, expressão protéica e do mRNA para PrP^{C} e o estudo *in vivo* da expressão da PrP^{C} em animais submetidos à angioplastia, não observamos um perfil de atividade antioxidante para a PrP^{C} . O que não descarta a hipótese desta proteína estar envolvida em outro tipo de resposta celular ao estresse oxidativo, considerando o aumento intenso da expressão do mRNA para PrP^{C} nas artérias ilíacas logo após a lesão.

A busca de uma função fisiológica para a PrP^{C} em células vasculares torna-se um campo de pesquisa a ser explorado. Uma vez que foi levantada a hipótese da

atividade *SOD-like* para a PrP^C no tecido neuronal e que observamos aumento intenso da expressão do seu mRNA, esta proteína pode ser uma ferramenta importante no tratamento de doenças cardiovasculares; onde o estresse oxidativo ao qual é submetido o órgão requer uma maior resposta antioxidante gerada pelo organismo.

Perspectivas Futuras

Embora não tenhamos observado atividade antioxidante da PrP^C em nosso modelo experimental, sentimos a necessidade de continuar em busca do papel fisiológico desta proteína, considerando que, nos animais estudados após a angioplastia, observamos um aumento bastante pronunciado do mRNA para a PrP^C logo após a lesão por balão. Assim, poderia ser realizada uma análise da expressão do mRNA para PrP^C e para as isoenzimas da SOD em animais, após um período menor de sobrevida (por exemplo, 24 horas e 48 horas), já que observamos um aumento expressivo do mRNA para PrP^C logo após a lesão, e, em 7 dias de sobrevida não mais.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Observamos um aumento significativo na atividade da SOD apenas nas amostras estimuladas com angiotensina II por 8 horas. Diminuição de atividade foi observada nas amostras estimuladas com tunicamicina e 7-cetocolesterol (após 4 horas), tunicamicina (após 8 horas), angiotensina II e 7-cetocolesterol (após 18 horas).
- As concentrações de cobre aumentaram nas amostras estimuladas com angiotensina II por 8 horas. Um aumento menos pronunciado foi observado nas amostras estimuladas por 18 horas com o mesmo estímulo.
- A expressão protéica das isoenzimas da SOD mostrou um perfil variado quando as células musculares lisas de aorta de coelho foram expostas aos agentes estressores do retículo endoplasmático nos diferentes tempos de incubação.
- A expressão da PrP^C diminuiu em todos os grupos de células na presença dos diferentes estímulos, independente do tempo de exposição.
- Para todos os agentes estressores, a transcrição do mRNA para PrP^C aumentou nas células estimuladas por 8 horas, enquanto nos dois outros períodos de incubação diminuiu em comparação ao controle.
- A expressão do mRNA para PrP^C, nas artérias ilíacas de coelhos submetidos a angioplastia, apresentou aumento intenso logo após a lesão. Entretanto, após 7 e 14 dias de sobrevida dos animais, a expressão foi similar ao controle.

Em nosso modelo, com os estímulos utilizados, ensaios para a atividade da SOD, concentração de cobre, expressão das isoenzimas da SOD, expressão protéica e do mRNA para PrP^C e o estudo *in vivo* da expressão da PrP^C em animais submetidos a angioplastia, não observamos um perfil de atividade antioxidante para a PrP^C. Todavia, isso não descarta a hipótese desta proteína estar envolvida em outro tipo de resposta celular ao estresse oxidativo, considerando o aumento intenso da expressão do mRNA para PrP^C nas artérias ilíacas logo após a lesão.

Assim, a análise dos resultados sugere que a atividade antioxidante proposta para a PrP^C pode ser dependente do tipo celular e/ou da resposta específica ao

estresse provocado. Esta atividade envolveria, também, a concentração de PrP^C presente nas células, as concentrações dos estímulos utilizados e o tipo de resposta das células vasculares ao estresse provocado.

Uma vez levantada a hipótese da atividade *SOD-like* para a PrP^C em outro tipo de tecido (neuronal) e que observamos aumento intenso da expressão do seu mRNA, esta proteína passa a ser uma ferramenta importante no tratamento de doenças cardiovasculares. Onde o estresse oxidativo ao qual é submetido o órgão requer uma maior resposta antioxidante gerada pelo organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, J.I.; BERK, B.C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, v.8, p. 59-63, 1998.

ALVES, L.P.; SANTOS, C.X.; AMANSO, A.M. et al. Early decrease in superoxide dismutase activity in vascular smooth muscle cells during endoplasmic reticulum stress. Resumo publicado na XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.

AZEVEDO, L.C.; PEDRO, M.A.; SOUZA, L.C. et al. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc. Res.*, v. 47, p. 436-445, 2000.

BALLINGER, S.W.; PATTERSON, C.; KNIGHT-LOZANO, C.A. et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*, v. 106, p. 544–549, 2002.

BARCLAY, G.R.; HOPE, J.; BIRKETT, C.R.; TURNER, M.L. Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry. *Br. J. Haematol.*, v. 107, p. 804-814, 1999.

BARRA, D.; SCHININA, M.E.; SIMMACO, M. et al. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 12595–12601, 1984.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 1620–1624, 1990.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, v. 271, p. C1424–C1437, 1996.

BESSOS, H.; DRUMMOND, O.; MACGREGOR, I. et al. The release of prion protein from platelets during storage of apheresis platelets. *Transfusion*, v. 41, n. 1, p. 61-66, 2001.

BLANC, A.; PANDEY, N.R.; SRIVASTAVA, A.K. Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. *Int. J. Mol. Med.*, v. 11, n. 2, p. 229–234, 2003.

BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, v. 218, p. 1309-1311, 1982.

BRORSON, J.R.; SCHUMACKER, P.T.; ZHANG, H. Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production. The Committees on Neurobiology and Cell Physiology. *J. Neurosci.*, v. 9, p.147–158, 1999.

BROWN, D.R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends. Neurosci.*, v. 24, n. 2, p. 85-90, 2001.

BROWN, D.R.; BESINGER, A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.*, v. 334, p. 423-429, 1998.

BROWN, D.R.; QIN, K.; HERMS, J.W. et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, v. 390, n. 6661, p. 684-687, 1997a.

BROWN, D.R.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.J.; SCHMIDT, B.; KRETZSCHMAR, H.A. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.*, v. 146, n. 1, p. 104-112, 1997b.

BROWN, D.R.; SCHMIDT, B.; KRETZSCHMAR, H.A. Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J. Neurochem.*, v. 70, p. 1686-1693, 1998.

BROWN, P.; CERVENAKOVA, L.; DIRINGER, H. Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 137, p. 5-13, 2001.

BROWN, D.R.; WONG, B.S.; HAFIZ, F. et al. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.*, v. 344, p. 1-5, 1999.

BROWN D.R., NICHOLAS R.S., CANEVARI L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J. Neurosci. Res.*, v. 67, n. 2, p. 211-224, 2002.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role of oxidant stress. *Circ. Res.*, v. 87, p. 840-844, 2000.

CASHMAN, N.R.; LOERTSCHER, R; NALBANTOGLU, J. et al. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, v. 61, p. 185-192, 1990.

CAUGHEY, B.; CHESEBRO, B. Prion Protein and the Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Trends Cell. Biol.*, v. 7, p. 56-62, 1997.

CHAN, P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 21, n. 1, p. 2–14, 2001.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, v. 49, p. 481–93, 1993.

COOKE, C.L.; DAVIDGE, ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc. Res.*, v. 60, p. 635–642, 2003.

CRAPO, J.D.; OURY, T.; RABOUILLE, C. et al. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 10405–10409, 1992.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letts.*, v. 369, p.131–135, 1995.

DHANABAL, M.; RAMCHANDRAN, R.; WATERMAN, M.J.F. et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 17, p. 11721-11726, 1999.

DIDION, S.P.; KINZENBAW, D.A.; FARACI, F.M. Critical role for CuZn–Superoxide Dismutase in preventing angiotensin II–induced endothelial dysfunction. *Hypertension*, v. 46, p. 1147-1153, 2005.

DIDION, S.P.; RYAN, M.J.; DIDION, L.A. et al. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ. Res.*, v. 91, p. 938–944, 2002.

DODELET, V.C.; CASHMAN, N.R. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood*, v. 91, p. 1556-1561, 1998.

FARACI, F.M.; DIDION, S.P. Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 24, p. 1367-1373, 2004.

FATTMAN, C.L.; ENGHILD, J.J.; CRAPO, J.D. et al. Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 275, n. 2, p. 542–548, 2000.

FATTMAN, C.L.; SCHAEFER, L.M.; OURY, T.D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 35, p. 236–256, 2003.

FLOHÉ, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.*, v. 105, p. 93-104, 1984.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 64, p. 97-112, 1995.

FUKAI, T.; GALIS, Z.S.; MENG, X.P. et al. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, v. 101, p. 2101–2111, 1998.

FUKAI, T.; SIEGFRIED, M.R.; USHIO-FUKAI, M. et al. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ. Res.*, v. 85, p. 23–28, 1999.

FUKAI, T.; SIEGFRIED, M.R.; USHIO-FUKAI, M. et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest.*, v. 105, p. 1631–1639, 2000.

FUKAI, T.; FOLZ, R.J.; LANDMESSER, U.; HARRISON, D.G. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.*, v. 55, p. 239–249, 2002.

GLATZCL, M.; AGUZZI, A. Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes. Infect.*, v. 2, p. 613-619, 2000.

GLOCKSHUBER, R.; HORNEMANN, S.; BILLETER, M. et al. Prion protein structural features indicate possible relations to signal peptidases. *FEBS Letts.*, v. 426, p. 291-296, 1998.

GONZÁLEZ-IGLESIAS, R.; PAJARES, M.A.; OCAL, C. et al. Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. *J. Mol. Biol.*, v. 319, p. 527–540, 2002.

GRIENDLING, K.K.; MINIERI, C.A.; OLLERENSHAW, J.D.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, v. 74, p. 1141–1148, 1994.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, v. 86, n. 5, p. 494–501, 2000.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; LASSEGUE, B.; USHIO-FUKAI, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 20, p. 2175–2183, 2000.

GUO, Z.M.; YANG, H.; HAMILTON, M.L. et al. Effects of age and food restriction on oxidative DNA damage and antioxidant enzyme activities in mouse aorta. *Mech. Ageing Dev.*, v. 122, p. 1771–1786, 2001.

GUO, W.; ADACHI, T.; MATSUI, R. et al. Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v. 285, p. H1396–H403, 2003.

HARRIS, D.A. Cellular Biology of Prion Diseases *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, n. 3, p. 429–444, 1999.

HERMS, J.; TINGS, T.; GALL, S. et al. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.*, v. 19, p. 8866–8875, 1999.

HOLADA, K.; MONDORO, T.H.; MULLER, J.; VOSTAL, J.G. Increased expression of phosphatidylinositol-specific phospholipase C resistant prion proteins on the surface of activated platelets. *Br. J. Haematol.*, v. 103, p. 276–82, 1998.

HOLADA, K.; SIMAK, J.; VOSTAL, J.G. Transmission of BSE by blood transfusion. *Lancet*, v. 356, p. 1771–1772, 2000.

HOLADA, K.; VOSTAL, J.G. Different levels of prion protein (PrP^c) expression on hamster, mouse and human blood cells. *Br. J. Haematol.*, v. 110, p. 472–480, 2000.

HORNSHAW, M.P.; MCDERMOTT, J.R.; CANDY, J.M. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 207, p. 621-629, 1995a.

HORNSHAW, M.P.; MCDERMOTT, J.R.; CANDY, J.M.; LAKEY, J.H. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 214, p. 993-999, 1995b.

HSIAO, K.; PRUSINER, S.B. Inherited human prion diseases. *Neurology*, v. 40, n. 12, p. 1820-1827, 1990.

HUTTER, G.; HEPPNER, F.L.; AGUZZI, A. No superoxide dismutase activity of cellular prion protein *in vivo*. *Biol. Chem.*, v. 384, p. 1279-1285, 2003.

IMLAY, J.A.; FRIDOVICH, I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 6957-6965, 1991.

INOUE, N.; RAMASAMY, S.; FUKAI, T. et al. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ. Res.*, v. 79, p. 32-37, 1996.

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ. Res.*, v. 87, p. 179-183, 2000.

JACOBSON, G.M.; DOURRON, H.M.; LUI, J. et al. Novel NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced superoxide and neointimal hyperplasia of carotid artery. *Circ. Res.*, v. 92, p. 637-643, 2003.

JANISZEWSKI, M.; PASQUALUCCI, C.A.; SOUZA, L.C. et al. Oxidized thiols markedly amplify the vascular response to balloon injury in rabbits through a redox active metal-dependent pathway. *Cardiovasc. Res.*, v. 39, p. 327-338, 1998.

JANISZEWSKI, M.; do CARMO, A.O.; PEDRO, M.A. et al. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit. Care Med.*, v. 32, n. 3, p. 1-8, 2004.

JENEY, V.; ITOH, S.; WENDT, M. et al. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circ. Res.*, v. 96, n. 7, p. 723–729, 2005.

JONES, S.; BATCHELOR, M.; BHELT, D. et al. Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. *Biochem. J.*, v. 392, p. 309-312, 2005.

JUNG, O.; MARKLUND, S.L.; GEIGER, H. et al. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability. In vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ. Res.*, v. 93, n. 7, p. 622–629, 2003.

KANEKO, M.; TAKAHASHI, T.; NIINUMA, Y.; NOMURA, Y. Manganese Superoxide Dismutase Is Induced by Endoplasmic Reticulum Stress through IRE1-Mediated Nuclear Factor (NF)- κ B and AP-1 Activation. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 27, n. 8, p. 1202–1206, 2004.

KANU, N.; IMOKAWA, Y.; DRECHSEL, D.N. et al. Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr. Biol.*, v. 12, p. 523-530, 2002.

KELLER, G.A.; WARNER, T.G.; STEIMER, K.S.; HALLEWELL, R.A. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 7381–7385, 1991.

KLAMT, F.; DAL-PIZZOL, F.; CONTE da FROTA, M.L. et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, n. 10, p. 1137-1144, 2001.

KOJDA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.*, v. 43, p. 562–571, 1999.

KUNSCH, C.; MEDFORD, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ. Res.*, v. 85, p. 753-766, 1999.

LANDMESSER, U.; MERTEN, R.; SPEIKERMANN, S. et al. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*, v. 101, p. 2264–2270, 2000.

LASSÈGUE, B.; SORESCU, D.; SZÖCS, K. et al. Novel gp91^{phox} homologues in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, v. 88, p. 888-894, 2001.

LAUGHLIN, M.H.; WELSHONS, W.V.; STUREK, M. et al. Gender, exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. *J. Appl. Physiol.*, v. 95, p. 250–264, 2003.

LAURINDO, F.R.; de SOUZA, H.P.; PEDRO, M.A.; JANISZEWSKI, M. Redox aspects of vascular response to injury. *Methods Enzymol.*, v. 352, p. 432-454, 2002.

LEGLEITER, L.R.; AHOLA, J.K.; ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W. Decreased brain copper due to copper deficiency has no effect on bovine prion proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 352, p. 884-888, 2007.

LEGNAME, G.; BASKAKOV, I.V.; NGUYEN, H.O. et al. Synthetic mammalian prions. *Science*, v. 305, p. 673-676, 2004.

LEITE, P.F.; DANILOVIC, A.; MORIEL, P. et al. Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, p. 2197-2202, 2003.

LEWEN, A.; MATZ, P.; CHAN, P.H. Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma*, v. 17, p. 871–890, 2000.

LI, L.; FINK, G.D.; WATTS, S.W. et al. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*, v. 107, p. 1053–1058, 2003.

LIYOU, W.; CHANG, L.Y.; GEUZE, H.J. et al. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 14, p. 201–207, 1993.

LIU, T.; LI, R.; PAN, T. et al. Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 47671-47678, 2002.

LIZARD, G.; GUELDRY, S.; SORDET, O. et al. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J.*, v. 12, p. 1651–1663, 1998.

LIZARD, G.; MONIER, S.; CORDELET, C. et al. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.19, p. 1190–1200, 1999.

MACGREGOR, I.; HOPE, J.; BARNARD, G. et al. Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components. *Vox Sang*, v. 77, n. 2, p. 88-96, 1999.

MACMILLAN-CROW, L.A.; CROW, J.P.; KERBY, J.D. et al. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 11853–11858, 1996.

MACMILLAN-CROW, L.A.; CRUTHIRDS, D.L. Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.*, v. 34, p. 325–336, 2001.

MARKLUND, S.L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 79, p. 7634–7638, 1982.

MARKLUND, S.L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.*, v. 222, p. 649–655, 1984.

MARKLUND, S.L.; HOLME, E.; HELLNER, L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta*, v. 126, p. 41–51, 1982.

MARTINET, W.; DE BIE, M.; SCHRIJVERS, D.M. et al. 7-Ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 24, p. 2296-2301, 2004.

MARTINS, V.R.; LINDEN, R.; PRADO, M.A. et al. Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett.*, v. 512, n. 1, p. 25-28, 2002.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 6049–6055, 1969.

McCORD, J.M. Human disease, free radicals, and the oxidant / antioxidant balance. *Clin. Biochem.*, v. 26, p. 351–357, 1993.

McCORD, J.M. Superoxide radical, controversies, contradictions and paradoxes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 209, p. 112-117, 1995.

MCKINLEY, M.P.; BOLTON, D.C.; PRUSINER, S.B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, v. 35, p. 57-62, 1983.

MESSMER, U.K.; BRINER, V.A.; PFEILSCHIFTER, J. Tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int.*, v. 55, p. 2322-2337, 1999.

MILLHAUSER, G. L. Copper Binding in the Prion Protein. *Acc. Chem. Res.*, v. 37, n. 2, p. 79-85, 2004.

MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 811, p. 60-67, 1997.

NONAKA, H.; TSUJINO, T.; WATARI, Y. et al. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation*, v. 104, p. 1165-1170, 2001.

NOZIK-GRAYCK, E.; SULIMAN, H.B.; PIANTADOSI, C.A. Extracellular superoxide dismutase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 37, p. 2466-2471, 2005.

O'BRIEN, W.J.; KREMA, C.; HEIMANN, T.; ZHAO, H. Expression of NADPH oxidase in rabbit corneal epithelial and stromal cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 47, p. 853-863, 2006.

O'CALLAGHAN, Y.C.; WOODS, J.A.; O'BRIEN, N.M. Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. *Cell Biol. Toxicol.*, v. 17, p. 127-137, 2001.

OKADA, K.; MINAMINO, T.; TSUKAMOTO, Y. et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation*, v. 110, p. 705-712, 2004.

OHTSUKA, M.; MIYASHITA, Y.; SHIRAI, K. Lipids deposited in human atheromatous lesions induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *J. Atheroscler. Thromb.*, v. 13, p. 256-262, 2006.

OURY, T.D.; DAY, B.J.; CRAPO, J.D. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.*, v. 75, p. 617–636, 1996.

OURY, T.D.; CRAPO, J.D.; VALNICKOVA, Z.; ENGHILD, J.J. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: A simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. J.*, v. 317, p. 51–57, 1996.

PACKER, L. *Methods Enzymol.*, v. 349, 2002.

PAGANO, P. NAD(P)H oxidase: marker of the dedifferentiated neointimal smooth muscle cell? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, p. 175–177, 2001.

PASSERINI, A.G.; POLACEK, D.C.; SHI, C. et al. Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 101, p. 2482–2487, 2004.

PEDRUZZI, E.; GUICHARD, C.; OLLIVER, V. et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell Biol.*, v. 24, n. 24, p. 10703–10717, 2004.

PHILLIS, J.W. A “radical” view of cerebral ischemic injury. *Prog. Neurobiol.*, v. 42, p. 441–448, 1994.

PRUSINER, S.B. Scrapie prions. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 43, p. 345–374, 1989.

PRUSINER, S.B. Molecular biology and transgenetics of prion diseases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v. 26, p. 397–438, 1991.

PRUSINER, S.B. Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, v. 278, p. 245–251, 1997.

PRUSINER, S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 13363–13383, 1998.

RACHIDI, W.; VILETTE, D.; GUIRAUD, P. et al. Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 9064-9072, 2003.

RAE, T.D.; SCHMIDT, P.J.; PUFAHL, R.A. et al. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, v. 284, n. 5415, p. 805–808, 1999.

REY, F.E.; PAGANO, P.J. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, p. 1962-1971, 2002.

ROUCOU, X.; GAINS, M.; LEBLANC, A.C. Neuroprotective functions of prion protein. *J. Neurosci. Res.*, v. 75, p. 153-161, 2004.

RUETZLER, C.A.; FURUYA, K.; TAKEDA, H.; HALLENBECK, J.M. Brain vessels normally undergo cyclic activation and inactivation: Evidence from tumor necrosis factor- α , heme oxygenase-1, and manganese superoxide dismutase immunostaining of vessels and perivascular brain cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 21, p. 244-252, 2001.

RUSH, J.W.E.; TURK, J.R.; LAUGHLIN, M.H. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am. J. Physiol.*, v. 284, p. H1378–H1387, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning A Laboratory Manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, v. 3.

SCHAFER, J.E.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, n. 11, p. 1191-212, 2001.

SEN, C.K.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene expression. *FASEB J.*, v. 10, p. 709-720, 1996.

SHIMAZAWA, M.; INOKUCHI, Y.; ITO, Y. et al. Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol. Vis.*, v. 13, p. 578-587, 2007.

SOUZA, H.P.; SOUZA, L.C.; ANASTÁCIO, V.M. et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 28, n. 8, p. 1232-1242, 2000.

STRALIN, P.; KURLSSON, K.; JOHANSSON, B.O.; MARKLUND, S.L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 15, p. 2032–2036, 1995.

SUZUKI, K.; TATSUMI, H.; SATOH, S. et al. Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells: localization and mechanism of induction. *Am. J. Physiol.*, v. 265, p. H1173–H1178, 1993.

SUZUKI, S.; OKUSE, Y.; KAWASE, M. et al. A norbergenin derivative inhibits neuronal cell damage induced by tunicamycin. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 7, p. 1335–1338, 2006.

SUSUKI, Y.J.; FORMAN, H.J.; SEVANIAN, A. Oxidants as simulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 22, p. 269–285, 1997.

SZOCS, K.; LASSEGUE, B.; SORESCU, D. et al. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, p. 21–27, 2002.

† HOEN, P.A.; VAN der LANS, C.A.C.; VAN ECK, M. et al. Aorta of apoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circ. Res.*, v. 93, n. 3, p. 262–269, 2003.

TERADA, L.S. Oxidative stress and endothelial activation. *Crit. Care Med.*, v. 30, p. S186–S191, 2002.

TREIBER, C.; PIPKORN, R.; WEISE, C. et al. Copper is required for prion protein-associated superoxide dismutase-I activity in *Pichia pastoris*. *FEBS J.*, v. 274, p. 1304–1311, 2007.

VISNER, G.A.; CHESROWN, S.E.; MONNIER, J. et al. Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 188, p. 453–462, 1992.

WAGGONER, D.J.; DRISALDI, B.; BARTNIKAS, T.B. et al. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 11, p. 7455–7458, 2000.

WANG, H.D.; JOHNS, D.G.; XU, S.; COHEN, R.A. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am. J. Physiol.*, v. 282, p. H1697–H1702, 2002.

WCISSMANN, C.; ENARI, M.; KLÖHN, P.C. et al. Transmission of prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 16378-16383, 2002.

WEISE, J.; CROME, O.; SANDAU, R. et al. Upregulation of cellular prion protein (PrP^C) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci. Lett.*, v. 372, p. 146-150, 2004.

WEISIGER, R.A.; FRIDOVICH, I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.*, v. 248, p.4793–4796, 1973.

WELCH, W.J.; BLAU, J.; XIE, H. et al. Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 288, p. H22–H28, 2005.

WHITE, A.R.; COLLINS, S.J.; MAHER, F. et al. Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am. J. Pathol.*, v. 155, p. 1723–1730, 1999.

WINGLER, K.; WÜNSCH, S.; KREUTZ, R. et al. Upregulation of vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the rennin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 31, n. 11, p. 1456-1464, 2001.

WINTJENS, R.; NOEL, C.; MAY, A.C. et al. Specificity and phenetic relationships of iron- and manganese-containing superoxide dismutases on the basis of structure and sequence comparisons. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 9248–9254, 2004.

WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc. Med.*, v. 11, p. 93–102, 2001.

WONG, B.S.; PAN, T.; LIU, T. et al. Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 273, p. 136–139, 2000.

WONG, B.S.; BROWN, D.R.; PAN, T. et al. Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities. *J. Neurochem.*, v. 79, p. 689–698, 2001a.

WONG, B.S.; LIU, T.; LI, R. et al. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J. Neurochem.*, v.76, p. 565–572, 2001b.

WOPFNER, F.; WEIDENHOFER, G.; SCHNEIDER, R. et al. Analysis of 27 mammalian and 9 avian prps reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.*, v. 289, p. 1163-1178, 1999.

YAN, Z.; HANSSON, G.K. Overexpression of inducible nitric oxide synthase by neointimal smooth muscle cells. *Circ. Res.*, v. 82, p. 21-29, 1998.

ZANETTI, M.; SATO, J.; KATUSIC, Z.S.; O'BRIEN, T. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 280, n. 6, p. H2516–H2523, 2001a.

ZANETTI, M.; SATO, J.; JOST, C.J. et al. Gene transfer of manganese superoxide dismutase reverses vascular dysfunction in the absence but not in the presence of atherosclerotic plaque. *Hum. Gene Ther.*, v. 12, n. 11, p. 1407–1416, 2001b.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CnZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 33, p. 337–349, 2002.

ZWIRSKA-KORCZALA, K.; ADAMCZYK-SOWA, M.; SOWA, P. et al. Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 58, n. 1, p. 53-64, 2007.

ANEXOS

ANEXO I

Determinação das concentrações de cobre

Laudo com os resultados da análise das concentrações de cobre nos homogenatos celulares encaminhados ao Laboratório de Análises Químicas e Ambiental do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) no Centro de Química e Meio ambiente – CQMA da USP.



01. N^o Páginas : 01/02

RELATÓRIO DE ANÁLISE

02. **PROCEDÊNCIA :** INCOR / USP

03. **ENDEREÇO :**

04. **INTERESSADO :** Sr.(a) : Liliete Canes Souza

05. **ANÁLISE SOLICITADA :** Cu

06. **AMOSTRA :** Homogenatos de culturas de células vasculares

07. **ORGÃO EXECUTOR :** INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Centro de Química e Meio Ambiente - CQMA
Avenida Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária – SP
CEP : 05508 - 000
Tel.: (011) 3816-9342 - Fax: (011) 3816-9325

08. **LABORATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS E AMBIENTAL**

09. **Cláusulas de Responsabilidade**

A . Os resultados obtidos se referem somente ao material submetido ao ensaio.

B . Não se admite qualquer responsabilidade referente à exatidão da amostragem, a menos que esta tenha sido efetuada mediante nossa própria supervisão. Salvo menção expressa, as amostras foram livremente selecionadas pelo solicitante.

C . A reprodução deste relatório está autorizada em sua forma integral. A reprodução parcial só é permitida com a autorização expressa do CQMA.

ATENÇÃO: As amostras deverão ser retiradas após 30 dias da data de emissão do laudo de análise. Após 60 dias da emissão do mesmo, o laboratório descartará as amostras não retiradas pelo cliente.

10. São Paulo, 08 de Janeiro de 2007



comissão nacional de energia nuclear
instituto de pesquisas energéticas e nucleares
 Centro de Química e Meio Ambiente – CQMA – E-mail: central@ipen.br

11. **Interessado :** Liliete Canes Souza
 12. **Registro Geral Nº :** 81 a 96/07
 13. **Amostra :** Homogenatos de culturas de células vasculares
 14. **Nº páginas :** 02/02

Relatório de Análise

Junho/2005

15. **Analista :** Dra. Elizabeth Sonoda Keiko Dantas
 16. **Técnica Analítica :** AAS – FORNO DE GRAFITE
 17. **Laboratório:** Laboratório de Análises Químicas e Ambiental

18. RESULTADOS :

RG	Ident. da Amostra	Elemento - Composto - Parâmetro			
		Cu µg/mL			
81/07	ET 4	0,26±0,02			
82/07	ET 8	0,36±0,01			
83/07	ET 18	1,43±0,01			
84/07	A 4	0,19±0,01			
85/07	A 8	1,44±0,01			
86/07	A 18	0,44±0,01			
87/07	T 4	0,14±0,01			
88/07	T 8	0,17±0,05			
89/07	T 18	0,13±0,01			
90/07	TKC 4	Não analisada			
91/07	TKC 8	0,13±0,04			
92/07	TKC 18	0,16±0,05			
93/07	C 4	0,13±0,01			
94/07	C 8	0,26±0,01			
95/07	C 18	0,200±0,01			
96/07	Tampão	0,113±0,01			

19.

03	01	07
Data Entrada		

08	01	07
Data Saída		

20. COMENTÁRIOS :

Todas as amostras foram diluídas a 10 mL, utilizando todo o volume das amostras.
 O branco já foi descontado do resultado final das amostras.
 Por perda da amostra durante a diluição, a amostra TKC4 não foi analisada.

21. Dra Maria Ap. F. Pires - CRQ: 04108833
Centro de Química e Meio Ambiente
Gerente

MSc. Marycel E. B. Cotrim - CRQ: 04121797
Responsável pelo Laboratório

Avenida Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000
 Fone: (011) 3816-9342 - Fax: (011) 3816-9325 - São Paulo - SP

FM-CQMA-0901-05 V2